THESE

présentée

A l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE et MEDICALE de GRENOBLE

pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR de 3ème CYCLE de CHIMIE BIOLOGIQUE

par

Brigitte DUFOUR-FOUQUE

DERIVES de la DIHYDRO-5,6 THYMIDINE.

ACTION INHIBITRICE sur la THYMIDINE KINASE des CELLULES d'ASCITES d'EHRLICH

Soutenue le 12 septembre 1973 devant la Commission d'Examen :

MM. BARNOUD — *Président*

PELMONT, TEOULE } *Examinateurs*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0037

THESE

présentée

A l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE et MEDICALE de GRENOBLE

pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR de 3ème CYCLE de CHIMIE BIOLOGIQUE

par

Brigitte DUFOUR-FOUQUE

DERIVES de la DIHYDRO-5,6 THYMIDINE.

ACTION INHIBITRICE sur la THYMIDINE KINASE des CELLULES d'ASCITES d'EHRLICH

Soutenue le 12 septembre 1973 devant la Commission d'Examen :

MM. BARNOUD *Président*

PELMONT, TEOULE } *Examinateurs*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je suis profondément reconnaissante à Monsieur le Professeur BARNOUD, de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, Chef du laboratoire de Biosynthèse de la cellulose au Centre d'Etudes et de Recherche des Macromolécules Végétales, pour l'honneur qu'il me fait de présider cette thèse.

Je tiens à exprimer une profonde gratitude à Monsieur TEOULE, Chef du laboratoire de Radiobiologie du Département de Recherche Fondamentale du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble. Pendant les deux années que j'ai passé dans son laboratoire, il m'a fait bénéficier de sa grande expérience et ne m'a ménagé ni son temps, ni ses conseils.

Monsieur PELMONT, Maître de Conférences à l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, a toujours apporté à mon travail une bienveillante attention. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie vivement tous les services généraux du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble qui m'ont permis la réalisation de cette thèse.

Je suis heureuse d'exprimer enfin, mes remerciements à tous mes collègues du laboratoire qui m'ont permis de mener à bien cette étude dans une ambiance sympathique.

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE et MEDICALE de GRENOBLE

_:_

LISTE des PROFESSEURS

Président : Monsieur Michel SOUTIF

Vice Président : Monsieur Gabriel CAU

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	ANGLES d'AURIAC Paul	Mécanique des fluides
	ARNAUD Georges	Clinique des maladies infectieuses
	ARNAUD Paul	Chimie
	AUBERT Guy	Physique
	AYANT Yves	Physique approfondie
Mme	BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
MM.	BARBIER Jean-Claude	Physique expérimentale
	BARBIER Reynold	Géologie appliquée
	BARJON Robert	Physique nucléaire
	BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la cellulose
	BARRA Jean-René	Statistiques
	BARRIE Joseph	Clinique chirurgicale
	BENOIT Jean	Radioélectricité
	BERNARD Alain	Mathématiques Pures
	BESSON Jean	Electrochimie
	BEZES Henri	Chirurgie générale
	BLAMBERT Maurice	Mathématiques Pures
	BOLLIET Louis	Informatique (IUT B)
	BONNET Georges	Electrotechnique
	BONNET Jean-Louis	Clinique ophtalmologique
	BONNET-EYMARD Joseph	Pathologie médicale
	BONNIER Etienne	Electrochimie Electrométallurgie
	BOUCHERLE André	Chimie et Toxicologie
	BOUCHEZ Robert	Physique Nucléaire
	BOUSSARD Jean-Claude	Mathématiques Appliquées
	BRAVARD Yves	Géographie
	BRISSONNEAU Pierre	Physique du Solide
	BUYLE-BODIN Maurice	Electronique
	CABANEL Guy	Clinique rhumatologique et hydrologie
	CALAS François	Anatomie
	CARRAZ Gilbert	Biologie animale et pharmacodynamie
	CAU Gabriel	Médecine légale et Toxicologie
	CAUQUIS Georges	Chimie organique
	CHATAUDY Claude	Mathématiques Pures
	CHARACHON Robert	Oto-Rhino-Laryngologie
	CHATEAU Robert	Thérapeutique
	CHENE Marcel	Chimie papetière
	COEUR André	Pharmacie chimique
	CONTAMIN Robert	Clinique gynécologique
	COUDERC Pierre	Anatomie Pathologique
	CRAYA Antoine	Mécanique
Mme	DEBELMAS Anne-Marie	Matière médicale
MM.	DEBELMAS Jacques	Géologie générale
	DEGRANGE Charles	Zoologie
	DESRE Pierre	Métallurgie
	DESSAUX Georges	Physiologie animale

MM.	DODU Jacques	Mécanique appliquée
	DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas
	DREYFUS Bernard	Thermodynamique
	DUCROS Pierre	Cristallographie
	DUGOIS Pierre	Clinique de Dermatologie et Syphiligraphie
	FAU René	Clinique neuro-psychiatrie
	FELICI Noël	Electrostatique
	GAGNAIRE Didier	Chimie physique
	GALLISSOT François	Mathématiques Pures
	GALVANI Octave	Mathématiques Pures
	GASTINEL Noël	Analyse numérique
	GEINDRE Michel	Electroradiologie
	GERBER Robert	Mathématiques Pures
	GIRAUD Pierre	Géologie
	KLEIN Joseph	Mathématiques Pures
Mme	KOFLER Lucie	Botanique et Physiologie végétale
MM.	KOSZUL Jean-Louis	Mathématiques Pures
	KRAVTCHENKO Julien	Mécanique
	KUNTZMANN Jean	Mathématiques Appliquées
	LACAZE Albert	Thermodynamique
	LACHARME Jean	Biologie végétale
	LAJZEROWICZ Joseph	Physique
	LATREILLE René	Chirurgie générale
	LATURAZE Jean	Biochimie pharmaceutique
	LAURENT Pierre	Mathématiques Appliquées
	LEDRU Jean	Clinique médicale B
	LLIBOUTRY Louis	Géophysique
	LOUP Jean	Géographie
Mlle	LUTZ Elizabeth	Mathématiques Pures
	MALGRANGE Bernard	Mathématiques Pures
	MALINAS Yves	Clinique obstétricale
	MARTIN-NOEL Pierre	Séméiologie médicale
	MASSEPORT Jean	Géographie
	MAZARE Yves	Clinique médicale A
	MICHEL Robert	Minéralogie et Pétrographie
	MOURIQUAND Claude	Histologie
	MOUSSA André	Chimie nucléaire
	NEEL Louis	Physique du Solide
	OZENDA Paul	Botanique
	PAUTHENET René	Electrotechnique
	PAYAN Jean-Jacques	Mathématiques Pures
	PEBAY-PEYROULA Jean-Claude	Physique
	PERRET René	Servomécanismes
	PILLET Emile	Physique industrielle
	RASSAT André	Chimie systématique
	RENARD Michel	Thermodynamique
	REULOS René	Physique industrielle
	RINALDI Renaud	Physique
	ROGET Jean	Clinique de pédiatrie et de puériculture
	SANTON Lucien	Mécanique
	SEIGNEURIN Raymond	Microbiologie et Hygiène
	SENGEL Philippe	Zoologie
	SILBERT Robert	Mécanique des fluides
	SOUTIF Michel	Physique général
	TANCHE Maurice	Physiologie
	TRAYNARD Philippe	Chimie générale
	VAILLAND François	Zoologie
	VALENTIN Jacques	Physique Nucléaire
	VAUQUOIS Bernard	Calcul électronique

Mme	VERAIN Alice	Pharmacie galénique
M.	VERAIN André	Physique
Mme	VEYRET Germaine	Géographie
MM.	VEYRET Paul	Géographie
	VIGNAIS Pierre	Biochimie médicale
	YOCCOZ Jean	Physique nucléaire théorique

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	BULLEMER Bernhard	Physique
	HANO JUN-ICHI	Mathématiques Pures
	STEPHENS Michaël	Mathématiques Appliquées

PROFESSEURS sans CHAIRE

MM.	BEAUDOING André	Pédiatrie
Mme	BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques Pures
MM.	BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques Appliquées
	BIAREZ Jean-Pierre	Mécanique
	BONNETAIN Lucien	Chimie minérale
Mme	BONNIER Jane	Chimie générale
MM.	CARLIER Georges	Biologie végétale
	COHEN Joseph	Electrotechnique
	COUMES André	Radioélectricité
	DEPASSEL Roger	Mécanique des Fluides
	DEPORTES Charles	Chimie minétale
	GAUTHIER Yves	Sciences biologiques
	GAVEND Michel	Pharmacologie
	GERMAIN Jean-Pierre	Mécanique
	GIDON Paul	Géologie et Minéralogie
	GLENAT René	Chimie organique
	HACQUES Gérard	Calcul numérique
	JANIN Bernard	Géographie
Mme	KAHANE Josette	Physique
MM.	MULLER Jean-Michel	Thérapeutique
	PERRIAUX Jean-Jacques	Géologie et minéralogie
	POULOUJADOFF Michel	Electrotechnique
	REBECQ Jacques	Biologie (CUS)
	REVOL Michel	Urologie
	REYMOND Jean-Charles	Chirurgie générale
	ROBERT André	Chimie papetière
	De ROUGEMONT Jacques	Neurochirurgie
	SARRAZIN Roger	Anatomie et chirurgie
	SARROT-REYNAULD Jean	Géologie
	SIBILLE Robert	Construction Mécanique
	SIROT Louis	Chirurgie générale
Mme	SOUTIF Jeanne	Physique générale

MAITRES de CONFERENCES et MAITRES de CONFERENCES AGREGES

Mlle	AGNIUS-DELORD Claudine	Physique pharmaceutique
	ALARY Josette	Chimie analytique
MM.	AMBLARD Pierre	Dermatologie
	AMBROISE-THOMAS Pierre	Parasitologie
	ARMAND Yves	Chimie
	BEGUIN Claude	Chimie organique
	BELORIZKY Elie	Physique
	BENZAKEN Claude	Mathématiques Appliquées
	BILLET Jean	Géographie
	BLIMAN Samuel	Electronique (EIE)

M.	BLOCH Daniel	Electrotechnique
Mme	BOUCHE Liane	Mathématiques (CUS)
MM.	BOUCHET Yves	Anatomie
	BOUVARD Maurice	Mécanique des Fluides
	BRODEAU François	Mathématiques (IUT B)
	BRUGEL Lucien	Energétique
	BUISSON Roger	Physique
	BUTEL Jean	Orthopédie
	CHAMBAZ Edmond	Biochimie médicale
	CHAMPETIER Jean	Anatomie et organogénèse
	CHIAVERINA Jean	Biologie appliquée (EFP)
	CHIBON Pierre	Biologie animale
	COHEN-ADDAD Jean-Pierre	Spectrométrie physique
	COLOMB Maurice	Biochimie médicale
	CONTE René	Physique
	COULOMB Max	Radiologie
	CROUZET Guy	Radiologie
	DURAND Francis	Métallurgie
	DUSSAUD René	Mathématiques (CUS)
Mme	ETERRADOSSI Jacqueline	Physiologie
MM.	FAURE Jacques	Médecine légale
	GENSAC Pierre	Botanique
	GIDON Maurice	Géologie
	GRIFFITHS Michaël	Mathématiques Appliquées
	GROULADE Joseph	Biochimie médicale
	HOLLARD Daniel	Hématologie
	HUGONOT Robert	Hygiène et Médecine préventive
	IDELMAN Simon	Physiologie animale
	IVANES Marcel	Electricité
	JALBERT Pierre	Histologie
	JOLY Jean-René	Mathématiques Pures
	JOUBERT Jean-Claude	Physique du Solide
	JULLIEN Pierre	Mathématiques Pures
	KAHANE André	Physique générale
	KUHN Gérard	Physique
	LACOUME Jean-Louis	Physique
Mme	LAJZEROWICZ Jeannine	Physique
MM.	LANCIA Roland	Physique atomique
	LE JUNTER Noël	Electronique
	LEROY Philippe	Mathématiques
	LOISEAUX Jean-Marie	Physique Nucléaire
	LONGEQUEUE Jean-Pierre	Physique Nucléaire
	LUU DUC Cuong	Chimie Organique
	MACHE Régis	Physiologie végétale
	MAGNIN Robert	Hygiène et Médecine préventive
	MARECHAL Jean	Mécanique
	MARTIN-BOUYER Michel	Chimie (CUS)
	MAYNARD Roger	Physique du Solide
	MICHOULIER Jean	Physique (IUT A)
	MICOUD Max	Maladies infectieuses
	MOREAU René	Hydraulique (INP)
	NEGRE Robert	Mécanique
	PARAMELLE Bernard	Pneumologie
	PECCOUD François	Analyse (IUT B)
	PEFFEN René	Métallurgie
	PELMONT Jean	Physiologie animale
	PERRET Jean	Neurologie
	PERRIN Louis	Pathologie expérimentale
	PFISTER Jean-Claude	Physique du Solide
	PHELIP Xavier	Rhumatologie

Mlle	PIERY Yvette	Biologie animale
MM.	RACHAIL Michel	Médecine interne
	RACINET Claude	Gynécologie et obstétrique
	RENAUD Maurice	Chimie
	RICHARD Lucien	Botanique
Mme	RINAUDO Marguerite	Chimie macromoléculaire
MM.	ROMIER Guy	Mathématiques (IUT B)
	SHOM Jean-Claude	Chimie Générale
	STIEGLITZ Paul	Anesthésiologie
	STOEBNER Pierre	Anatomie pathologie
	VAN CUTSEM Bernard	Mathématiques Appliquées
	VEILLON Gérard	Mathématiques Appliquées (INP)
	VIALON Pierre	Géologie
	VOOG Robert	Médecine interne
	VROUSSOS Constantin	Radiologie
	ZADWORNY François	Electronique

MAITRES de CONFERENCES ASSOCIES

MM.	BOUDOURIS Georges	Radioélectricité
	CHEEKE John	Thermodynamique
	GOLDSCHMIDT Hubert	Mathématiques
	SIDNEY STUARD	Mathématiques Pures
	YACOUD Mahmoud	Médecine légale

CHARGES de FONCTIONS de MAITRES de CONFERENCES

Mme	BERIEL Hélène	Physiologie
Mme	RENAUDET Jacqueline	Microbiologie

SOMMAIRE

Page

INTRODUCTION.

INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES. 1

A/ INHIBITEURS N'INTERVENANT PAS DANS LE METABOLISME DES NUCLEOTIDES. 2

1°) Interdiction à l'ADN d'agir comme matrice. 2

a) intercalation entre les brins d'ADN 2
b) intercalation dans les sillons de l'ADN 3
c) formation de liaisons covalentes avec l'ADN. 4

2°) Interférence directe avec les enzymes impliqués dans la replication des acides nucléiques. 4

B/ MODE D'ACTION DES INHIBITEURS DU METABOLISME DES NUCLEOTIDES. 5

1°) Inhibiteurs de la synthèse des nucléotides. 5

2°) Inhibiteurs de l'interconversion des nucléotides. 12

3°) Incorporation des analogues dans les polynucléotides. 15

1ère PARTIE.

SYNTHESE D'ANALOGUES STRUCTURAUX DE THYMIDINE. 17

CHAPITRE I.

CONCEPTION ET SYNTHESE DES ANALOGUES STRUCTURAUX. 17

Page

SYNTHESE DU BROMO-5 BENZOYLOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMIDINE. 19

SYNTHESE DES BROMO-5 ALKOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMIDINE. 25

SYNTHESE DE COMPOSES APPARENTES. 26

- Bromo-5 Hydroxyméthyl-5 methoxy-6 Dihydro-5,6 désoxyuridine.
- Ethoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine.

CHAPITRE II.

CARACTERISATION DES COMPOSES SYNTHETISES. 28

I - ETUDE DES SPECTRES D'ABSORPTION ULTRAVIOLETTE ET INFRA-ROUGE. 28

II - ETUDE DES SPECTRES DE RMN. 30

III - ETUDE DES SPECTRES DE MASSE. 38

CHAPITRE III.

PARTIE EXPERIMENTALE 48

I - METHODES GENERALES. 48

- Séparation des composés. 48
- Identification et caractérisation des composés. 49

II - BROMO-5 ALKOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMINE DESOXYRIBOSIDE. 50

1°) Synthèse du Bromo-5 Methoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine. 50

2°) Synthèse du Bromo-5 Ethoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine. 53

3°) Synthèse de l'Ethoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine. 55

4°) Synthèse du Bromo-5 Butoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine. 55

5°) Synthèse du Bromo-5 Isoamyloxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine. 57

6°) Synthèse du Bromo-5 Hydroxyméthyl-5 Methoxy-6 Dihydro-5,6 Désoxy-uridine. 58

a) Préparation de 1'hydroxyméthyl-5 désoxyuridine 58

b) Addition sur la double liaison 5,6 de Me-O-Br. 62

III - BROMO-5 ALCOYLOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMINE DESOXYRIBOSIDE. 63

1) Synthèse des Composés. 63

2) Séparation des produits. 63

3) Caractérisation des produits. 64

2ème PARTIE.

ETUDE BIOLOGIQUE DES NUCLEOSIDES MODIFIES. 67

INTRODUCTION.

METHODES D'ETUDE DES INHIBITEURS.

1) Utilisation de Précurseurs radioactifs. 67

2) Etudes enzymatiques des inhibiteurs. 68

CHAPITRE I.

ACTION DES ANALOGUES DE THYMIDINE SUR L'INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS DANS L'ADN DES CELLULES D'ASCITES D'EHRLICH. 70

A/ METHODES EXPERIMENTALES. 70

1) Préparation du milieu d'incubation. 71

2) Mesure de la biosynthèse de 1'ADN. 71

Page

B/ RESULTATS ET DISCUSSION. 73

1) Incorporation de Thymidine radioactive. 73

2) Incorporation de la désoxyguanosine et de la désoxycytidine radioactives. 80

CHAPITRE II.

DETERMINATION DU SITE D'ACTION DES INHIBITEURS. ETUDE DE LA THYMIDINE KINASE DES CELLULES D'ASCITES D'EHRLICH. 81

I - PARTIE THEORIQUE. 81

A/ DEFINITIONS. 81

B/ CINETIQUES ENZYMATIQUES. 81

C/ ACTION DES INHIBITEURS SUR LES ENZYMES 82

II - ETUDE EXPERIMENTALE. 86

A/ EXTRACTION DE LA THYMIDINE KINASE. 86

B/ CONDITIONS OPTIMALES DE FONCTIONNEMENT DE L'ENZYME. 87

1°) pH optimum

2°) Température optimum

3°) Besoin en Magnesium et ATP.

C/ METHODES EXPERIMENTALES. 88

1°) Materiel et Produits.

2°) Phosphorylation de la Thymidine.

Page

D/ ETUDE GRAPHIQUE DE LA THYMIDINE KINASE ET DE SES INHIBITEURS. 90

1°) Constante de MICKAELIS et vitesse maximum 90

2°) Action des Analogues structuraux de la Thymidine. 91

3°) Conclusions. 92

3° PARTIE.

CONCLUSION GENERALE. 96

BIBLIOGRAPHIE 98

INTRODUCTION

INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES

Les acides nucléiques, l'acide ribonucléique (ou ARN) et l'acide désoxyribonucléique (ou ADN) jouent un rôle fondamental dans la vie de la cellule. Les biochimistes attribuent à ces macromolécules un rôle primordial dans des systèmes de plus en plus nombreux :

- le rôle de l'ADN en tant que dépôt principal de l'information génétique est bien admis aujourd'hui.

- le premier transfert d'informations à partir de l'ADN est effectué par l'intermédiaire de l'ARN messager.

- tous les types d'ARN (ARN messager, ARN "soluble" : ARN de transfert en majorité, ARN ribosomal) sont fondamentaux dans la biosynthèse protéique.

De ce fait, de toute modification dans le métabolisme ou le fonctionnement des acides nucléiques découlera une manifestation biologique. L'action des substances qui modifient le métabolisme normal des acides nucléiques pourra se traduire par un arrêt de croissance des organismes ou par leur mort.

L'étude des antagonistes des acides nucléiques présente deux pôles d'intérêt :

= dans la recherche fondamentale

Les inhibiteurs des acides nucléiques permettent d'étudier les voies métaboliques par une détermination de la séquence des réactions enzymatiques. Ils permettent aussi d'étudier avec précision les systèmes enzymatiques qu'ils inhibent : détermination du type d'inhibition, du mécanisme de la réaction enzymatique.

= dans le domaine médical

Certains inhibiteurs des acides nucléiques présentent des propriétés biologiques intéressantes : antibactérienne, antivirale, et antitumorale. (La chimiothérapie actuelle du cancer compte largement sur l'inhibition des acides nucléiques comme moyen de discrimination sélective des cellules tumorales à croissance très rapide).

Ces composés appartiennent à la classe des antibiotiques dont on sait la grande importance du point de vue clinique. Parmi ces substances, on trouve des antibiotiques naturels, des dérivés d'antibiotiques et des composés d'origine entièrement synthétique.

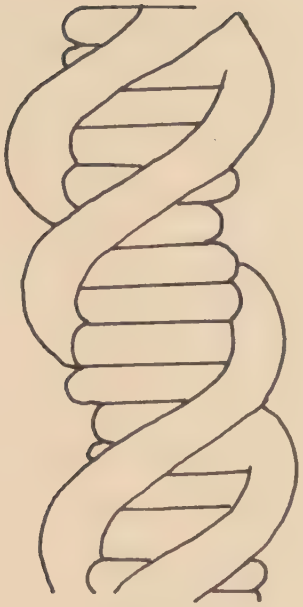
A - INHIBITEURS N'INTERVENANT PAS DANS LE METABOLISME DES NUCLEOTIDES.

Il est à noter que l'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques ne se situe pas seulement au niveau d'agents entrant en interférence avec le métabolisme des nucléotides. Cette inhibition peut avoir lieu au niveau de la polymérisation des nucléotides et selon deux processus :

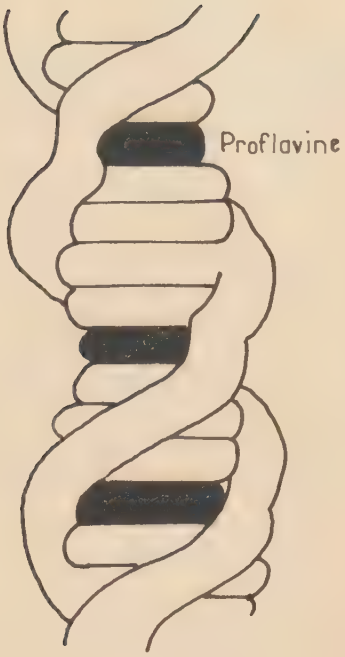
1°) - *Interdiction à l'ADN d'agir comme matrice.*

C'est le cas de la plupart des antibiotiques. Ces divers composés peuvent être classés selon trois modes d'action :

a) intercalation entre les brins d'ADN. Les molécules se placent entre les bases perpendiculairement à l'axe de l'hélice, entraînant une distorsion de celle-ci. Le composé type est la Proflavine, (44).



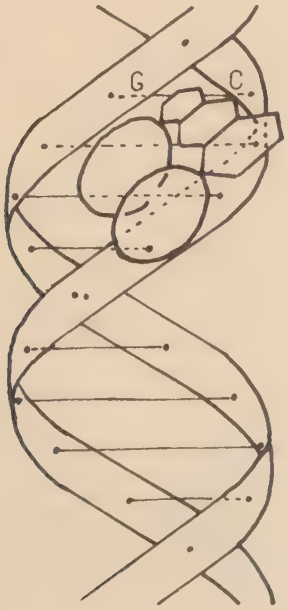
ADN NATIF



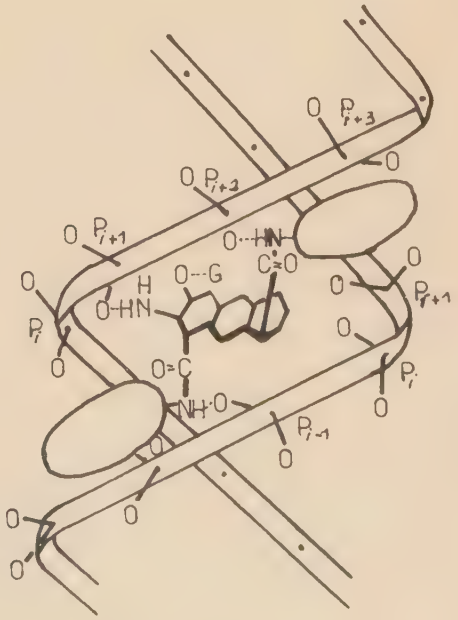
ADN MODIFIE

b) intercalation dans les sillons de l'ADN. Les composés peuvent se fixer dans les sillons (soit le grand, soit le petit) parallèlement ou perpendiculairement aux paires de bases.

L'acétyl aminofluorene se couche dans le grand sillon parallèlement aux bases ; quant à l'actinomycine D, son point d'action est le petit sillon mais son mode de fixation n'est pas unique : deux modèles sont proposés, l'un par HAMILTON (34) l'autre par GURSKY (35).

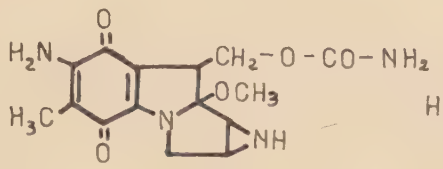


Modèle de HAMILTON

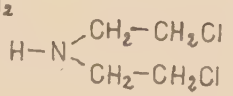


Modèle de GURSKY

c) Formation de liaisons covalentes avec l'ADN. Ces composés du type mitomycine C, moutarde à l'azote, forment des complexes covalents avec l'ADN. Ce sont des réactifs de pontage (76).



Mitomycine C

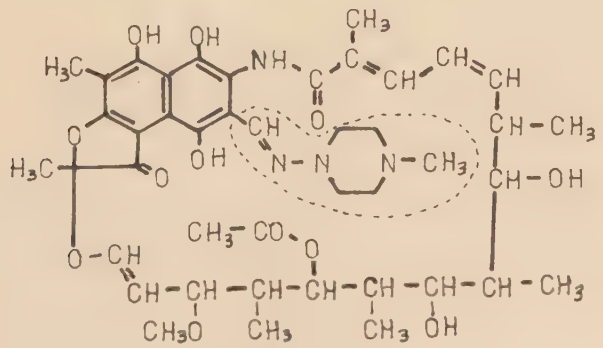


Moutarde à l'Azote

2°) - Interférence directe avec les enzymes impliqués dans la replication des acides nucléiques.

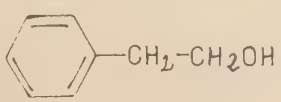
Les enzymes intéressés par ce type d'inhibiteurs sont l'ADN polymérase et l'ARN polymérase.

WEHRLI et ses collaborateurs de 1968 à 1970 (79,80,81) ont cherché à expliquer le mode d'action de la rifampicine sur la biosynthèse de l'ARN. Leurs travaux ont montré que cet antibiotique agissait, in vitro, par fixation directe sur l'ARN polymérase.



Rifampicine

L'ADN polymérase peut être inhibée de la même manière par des composés tels que l'alcool phényléthylique (30)



Bien que ces deux modes d'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques soient très importants, c'est l'inhibition au niveau du métabolisme des nucléotides qui présente pour nous le plus d'intérêt, car elle est liée à la nature de composés dont la structure est proche des nucléosides et nucléotides naturels. (fig. 1 et 2).

B - MODE D'ACTION DES INHIBITEURS DU METABOLISME DES NUCLEOTIDES.

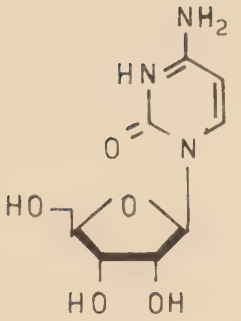
La plupart des composés appartenant à ce groupe agissent en inhibant des enzymes bien déterminés, et il est possible de distinguer quatre types d'action de base :

- inhibition de la synthèse de novo des purines et des pyrimidines (fig. 3 et 4)
- inhibition de l'interconversion des nucléotides
- inhibition de l'utilisation des nucléotides
- incorporation des analogues dans le polynucléotide.

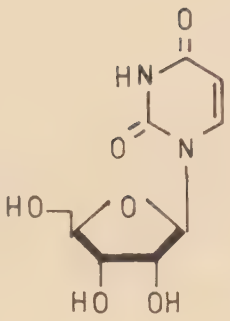
Cependant, aucun des composés n'est suffisamment spécifique pour n'appartenir qu'à une de ces catégories.

1) Inhibiteurs de la synthèse des nucléotides.-

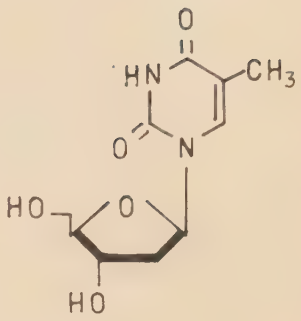
Les sites d'action des inhibiteurs de la synthèse de novo des nucléotides sont nombreux et correspondent aux étapes où interviennent certains enzymes ou certains substrats.



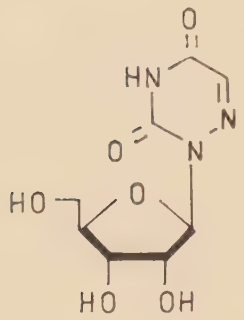
CYTIDINE



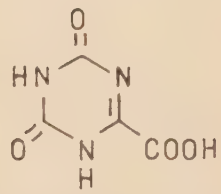
URIDINE



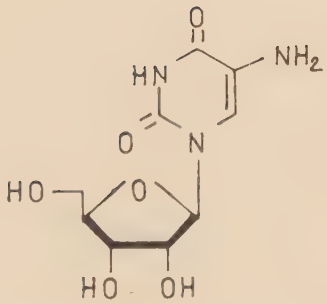
DeoxyTHYMIDINE



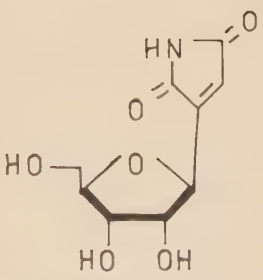
6-AZAURIDINE



ACIDE 5-AZAOROTIQUE

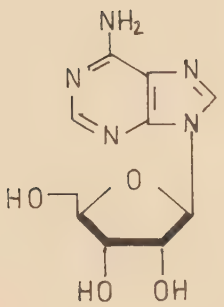


5-AMINOURIDINE

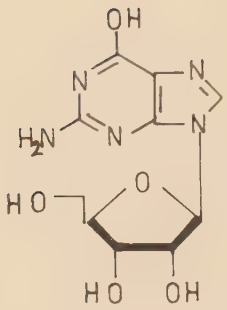


SHOWDOMYCINE

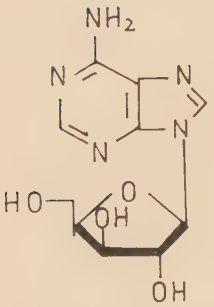
Fig. 1 Nucléosides pyrimidiques et analogues structuraux



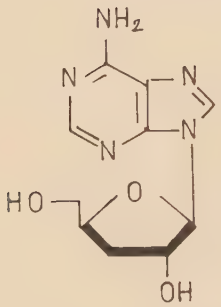
ADENOSINE



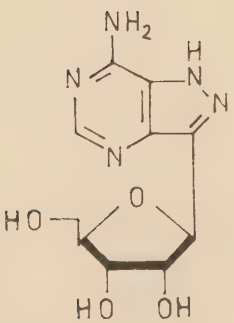
GUANOSINE



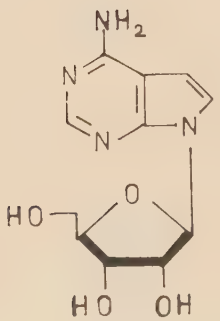
XYLOSYLADENINE



CORDYCEPINE



FORMYCINE



TUBERCIDINE

Fig. 2 Nucléosides puriques et analogues structuraux

Inhibiteurs de la synthèse des Purines.

COMPOSES	*ENZYMES INHIBES*	*REFERENCES BIBLIOGRA.*
9-β-D xylofuranosyl-adénine	Ribose phosphate pyrophosphokinase fig. 4. N° 1	Inhibiteur de la synthèse PRPP. ELLIS & LEPAGE (29)
Xylosyladénine	"	ROY-BURMAN (64)
Cordycépine	"	CUNNINGHAM (22), KACZKA (42) JAGGER (41) Inhibiteur des microorganismes, des cellules ascites d'Ehrlich. Inhibiteur de la synthèse de PRPP. ROTTMAN G. (63), OVERGAARD-HANSEN (57) KLENOW (43).
Decoyinine	Ribose phosphate pyrophosphokinase fig. 4. N° 1.	Inhibiteur de la croissance des microorganismes BLOCK & NICHOL (9).
Formycine	"	HORI (38)
6-mercaptopurine	Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase fig. 4 N° 2.	BALIS (5) Mécanisme d'action allostérique pseudo retro-inhibition.
2,6-diaminopurine 6-thioguanine	"	ATKINSON (1) BENNETT (8)
Azathiopurine	"	Dérivé de la 6-mercaptopurine même mode d'action ELION (28)
Thio-IMP	"	Antitumoral ROY BURMAN (64)
6-thio GMP	"	même action de le 6-thio IMP, WUNGAARDEN & ASHTON (84).
Azaserine 6-diazo 5-oxo L norleucine (DON)	Phosphoribosyl formyl glycine amide : L glutamine amido ligase (ADP) fig. 4 N° 3.	PITTILIO & HUNT (58) Seules les formes L sont actives ; azasérine : puissant inhibiteur du sarcome 180 des souris (STOCK 72) Action sur les levures et les bactéries. DON : même action.

./.

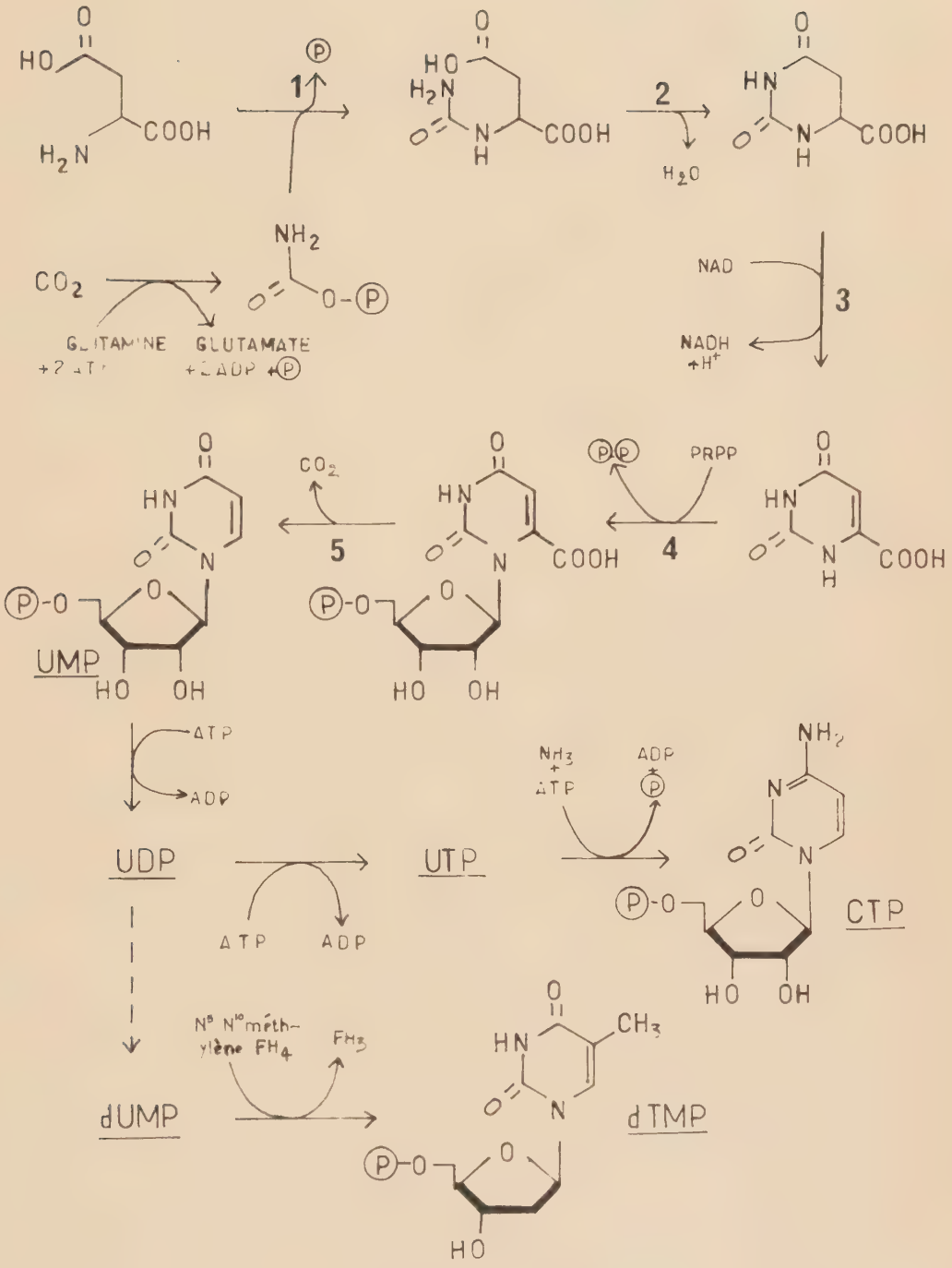


Fig 3 SYNTÈSE de novo DES PYRIMIDINES

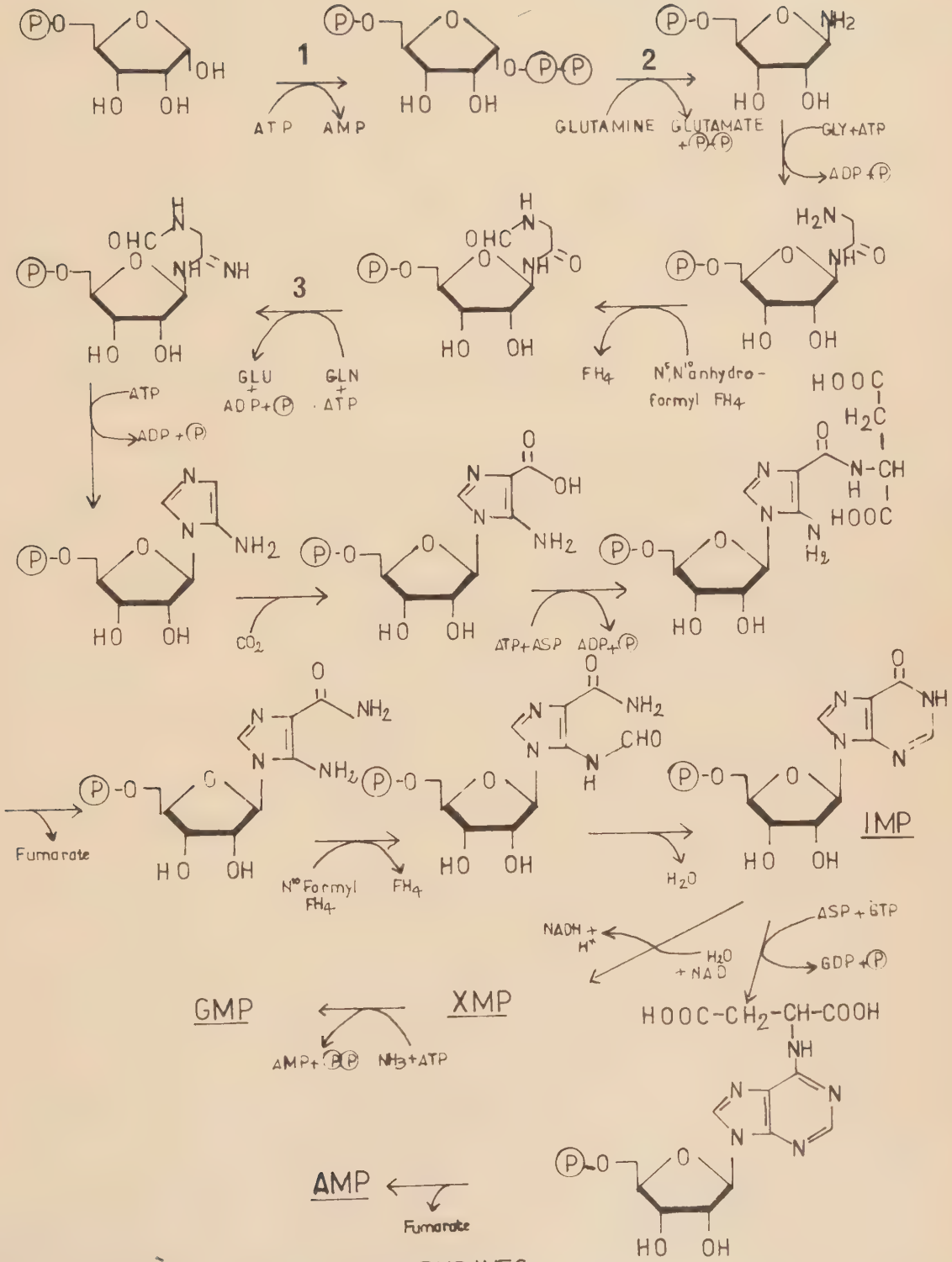


Fig 4 SYNTÈSE de novo DES PURINES

./.		
Methotrexate (fig.5)	dihydrofolate reductase	BALIS (6) antitumoral. Antifolate => diminution du pool.FH4 => pas de purines.
Trimethoprime (fig. 5)	"	antibactérien
pyrimethamine	"	antimalarial.

Inhibiteurs de la synthèse des pyrimidines.

COMPOSES	*ENZYMES INHIBES*	*REFERENCES BIBLIOGRA.*
Acide méthyl aspartique	Carbomoylphosphate : L aspartate carbamoyl transférase fig. 3 N° 1	WOOLEY (83) Inhibiteur puissant de la croissance d'E. coli. YATES et PARDEE (85)
5-fluorocytosine 6-azauracile	carbamyl Phosphate : L aspartate carbamoyl transférase	BRESNICK & HITCHINGS (12) SMITH & SULLIVAN (71)
5-azauracile	L 4,5-dihydroorotate amidohydrolase fig. 3 N° 2.	CIHAK & al (20)
5-fluroorotate	L 4,5-dihydroorotate : oxygène oxydoréductase fig. 3 N° 3.	SMITH & SULLIVAN (71).
acide 5-azaorotique	Orotidine 5'-phosphate pyrophosphorylase fig. 3 n° 4.	ROY BURMAN (64) Blocage de l'utilisation de l'orotate.
5-hydroxyuridylate	Orotidine 5' phosphate décarboxylase fig. 3 N° 5.	SMITH & VISSER (70)
6-azauridine 5-aminouridine	"	ROY BURMAN (64)

2) *Inhibiteurs de l'interconversion des nucléotides.*

L'inhibition de la biosynthèse des acides nucléiques peut avoir lieu à un stade plus avancé du métabolisme des nucléotides : au cours de leur interconversion.

Inhibiteurs de l'interconversion des purines.

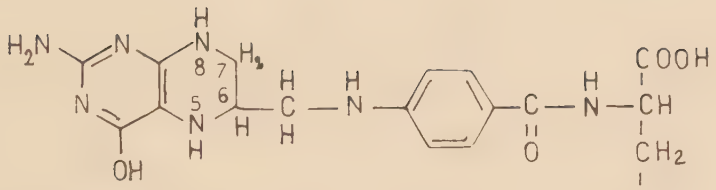
COMPOSES	*ENZYMES INHIBES*	*REFERENCES BIBLIOGRA.*
8-azaguanine	represseur de la synthèse de l'inosinate déhydrogenase	L'inosinate ne peut être transformé en xanthylate donc en guanylate. BROCKMAN (15)
Hadacidine	adenylosuccinate synthetase	antibiotique antitumoral. Analogue de l'aspartate. GORDON et SHIGEURA (68) SHIEGEURA (67)
Diaminopurine		Composé transformé en coenzyme non fonctionnel. BALIS (4).
6-mercaptopurine	IMP dehydrogenase	actif sur les bactéries ROY BURMAN (64)
Thio inosinate	adenylosuccinate synthétase	inhibiteur compétitif. Inhibition des enzymes des bactéries et des mammifères.
	adenylosuccinatelyase	ATKINSON (2)
6-methylmercaptopurine 6-propylmercaptopurine imuran		Ces composés sont dealkykés en 6-mercaptopurine.
6-chloropurine	XMP aminase	mode d'action similaire à celui du 6-mercaptopurine SARTORELLI & BOOTH (65).
Psicofuranine	XMP aminase	La synthèse de novo du guanylate est bloquée. SLECHTA (69).
Diazooxonorleucine (DON)	XMP aminase	BARCLAY (7).

./.

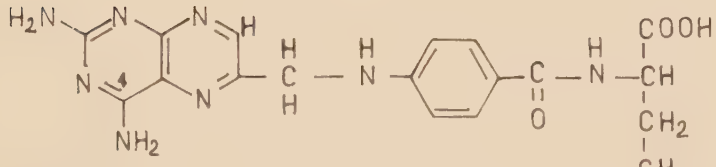
./.		
Inhibiteurs polycycliques. Colchicine Vinblastine Griséofulvine	:	Inhibiteurs mitotiques BALIS (6)
Ribosyl-4 amino-5 Imidazole carboxamide	adénosine deaminase	BALIS (6)

Inhibiteurs de l'interconversion des purimidines.

COMPOSES	*ENZYMES INHIBES*	*REFERENCES BIBLIOGRA.*
Halo-5 desoxyuridine	ATP : 5' thymidine phosphotransférase	OKAZAKI & KORNBERG (55)
Azadesoxythymidine	"	BRESNICK & THOMPSON (14)
D.O.N.	CTP synthetase	BALIS (6)
Antifolates : Aminoptérine Methotrexate	folate reductase	BALIS (6) Fixation très forte sur l'enzyme. Fixation considérée comme irréversible.
Acide 5-fluoro orotique	orotidine 5' phosphaste decarboxylase	Inhibition entre orotidylate et uridylate
Fluoro desoxy uridine 5' monophosphate	thymidylate synthetase	MATHEWS & COHEN (52) fixation irréversible sur l'enzyme. HEIDELBERGER (35, 37)
5-trifluoromethyl 2'-desoxyuridine 5'-monophosphate	thymidylate synthétase	REYES-HEIDELBERGER (62)
5-trifluoromethyl 2'-désoxyuridine	thymidylate synthétase	HEIDELBERGER-ANDERSON (36)
4-N hydroxy-2' desoxycytidine	desoxycytidylic deaminase. Thymidylate synthétase.	MALEY & MALEY (49) NELSON & CARTER (53)
Showdomycine	UMP Kinase	produit antitumoral ROY BURMAN (64) SUHADOLNICK (73)

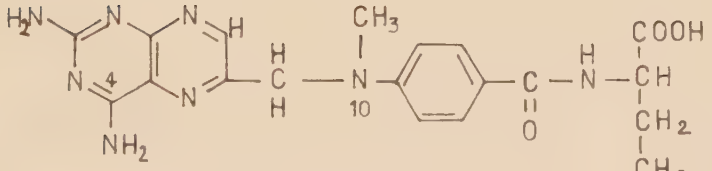


Acide 5,6,7,8, Tetrahydrofolique (FH_4)



Acide 4-Amino, 4-Desoxypteroylglutamique

(Aminoptérine)



Acide 4-Amino , 4-Desoxy , 10-Méthylptéroylglutamique

(Amethoptérine - Méthotrexate - MTX)

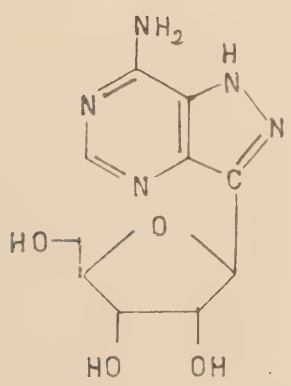
Fig. 5. Acide tetrahydrofolique et antifolates

3) Incorporation des analogues dans les polynucléotides.

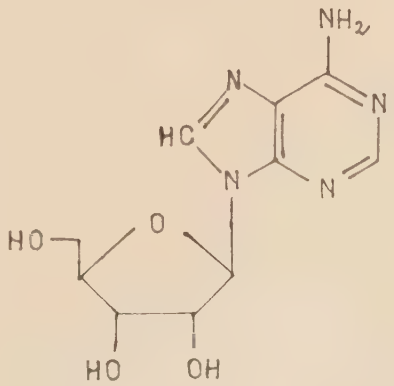
Comme la plupart des analogues structuraux des nucléosides contient le sucre normal (ribose ou désoxyribose) et une base plus ou moins modifiée, il n'est pas surprenant que ces composés soient phosphorylés jusqu'au stade triphosphate puis incorporés dans l'ADN et l'ARN par les réactions de polymérisation. Mais la présence de ces composés dans les chaînes d'acides nucléiques peut déformer les macromolécules par suite d'impossibilité de formation des liaisons hydrogène, ou par inversion de conformation au niveau de la liaison N-glycosidique. Cette déformation a pour résultat d'empêcher les enzymes de replication de se fixer donc d'inhiber ou de stopper la polymérisation.

La bromodésoxyuridine et l'iododésoxyuridine, contrairement à la fluoro désoxyuridine, sont incorporés dans les chaînes d'ADN à la place de la thymidine (ce résultat peut être expliqué par le fait que les rayons de Van der Waals de Br, I et CH_3 sont très voisins et respectivement égaux à 1,95 Å 2,15 Å et 2,0 Å.). La bromodésoxyuridine est peu employée en chimiothérapie alors que l'iododésoxyuridine présente une activité antivirale intéressante (59) due probablement à des erreurs au moment de la replication (59,64).

WARD & REICH (78) ont conclu de leurs expériences que les propriétés particulières des polyribonucléotides contenant de la formycine pouvaient être dues au fait que ces nucléosides adoptaient facilement la conformation syn, ce qui génait l'appariement des bases des acides nucléiques hélicoïdaux.



Formycine SYN



Adénosine ANTI

Un troisième type de substance est représenté par la cordycepine (3' désoxyadénosine) (32, 64, 73). Après incorporation en position 3' terminale des chaînes de ARN en cours de croissance, l'absence du groupement hydroxyle en 3' bloque l'élongation de la chaîne.

1ère PARTIE

SYNTHESE D'ANALOGUES STRUCTURAUX DE THYMIDINE

CHAPITRE I

CONCEPTION ET SYNTHESE DES ANALOGUES STRUCTURAUX

Jusqu'à présent, la chimiothérapie du cancer a été fondée sur l'étude des analogues des métabolites dont la sélectivité est due à l'identité de leurs propriétés à celles des cofacteurs et des précurseurs indispensables au processus métabolique vital qu'est la biosynthèse des acides nucléiques. Dans la conception d'un antimétabolite, l'intention est de créer un composé de structure très voisine d'un métabolite essentiel mais cependant suffisamment différent, de telle sorte que son insertion dans la voie métabolique appropriée provoque un effet "toxique". L'antimétabolite rentre avec succès en compétition avec le métabolite correspondant, l'empêchant de prendre sa place dans le métabolisme normal.

Un autre concept dans l'élaboration d'un antimétabolite est que son interférence avec les acides nucléiques dans la cellule,

soit modifiera sa capacité de multiplication,

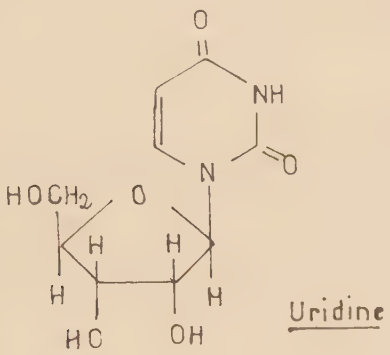
soit dans les cas extrêmes, l'empêchera totalement.

C'est pourquoi, de nombreuses purines et pyrimidines, analogues des bases naturelles des acides nucléiques, ont été essayées. Leur action consiste en une compétition antagoniste au cours de la synthèse des nucléotides, ou encore à un stade moins avancé, de telle sorte que la synthèse des acides nucléiques est bloquée ou en leur capacité d'être phosphorylés puis incorporés dans les acides nucléiques créant des macromolécules anormales. C'est le cas du fluoro-5 uracile, analogue des pyrimidines, dont l'action se situe à ces deux niveaux mais dont le plus important est le dernier.

Si les analogues des bases puriques et pyrimidiques ont une action intéressante antibactérienne, antivirale (24, 75) antifongique (25) et herbicide (46, 47, 48) et même d'autres activités thérapeutiques (18) les travaux de DUSCHINSKY en 1967 (26) ont montré l'action encore plus nette des

Notre but est donc de concevoir des analogues des nucléosides naturels de pyrimidine ayant une activité biologique et de déterminer avec précision cette activité.

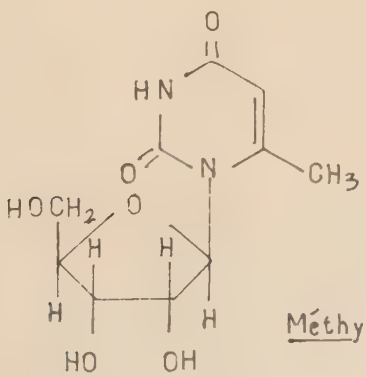
Les nucléosides naturels des pyrimidines sont formés de deux cycles : un sucre (ribose ou désoxyribose) sous forme furanique et d'une base (cytosine, uracile ou thymine) liés par un pont N-glycosidique. La rotation de la base autour de cette liaison est relativement libre mais la conformation privilégiée naturelle est la forme anti dans laquelle on note la proximité du C-6 de la base et du C-2' du sucre :



Uridine

Forme anti

La présence d'un substituant en 6 autre que l'hydrogène fausse la rotation du sucre, et de plus l'encombrement stérique du groupement donne au nucléoside une conformation différente. C'est le cas de la méthyl-6 cytidine, de la méthyl-6 uridine, qui ont une conformation Syn (66) et de l'orotidine (39).



Méthyl-6 Uridine

Forme Syn

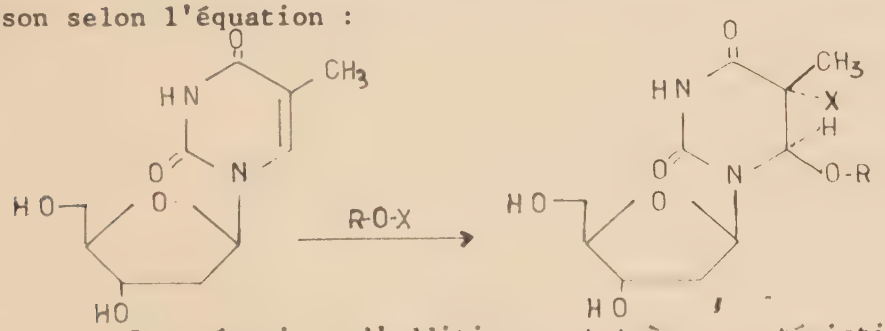
Il est intéressant de noter que parallèlement à sa modification de conformation, la 6-méthyl uridine sous forme triphosphate est un inhibiteur de la DNA polymérase et de tous les métabolismes intermédiaires qui passent par les nucléotides.

Les dihydropyrimidines, molécules peu étudiées jusqu'à présent, possèdent des propriétés intéressantes en thérapeutique (18). D'autre part, le rôle prépondérant de fonctions telles que $O-CO-C_6H_5$ a été mis en évidence dans certaines molécules (cocaïne, stéraïne).

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier le comportement d'un nucléoside de thymine, substitué en 6 par un groupement benzoyloxy et dont la double liaison est saturée.

Synthèse du Bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine.

La méthode de synthèse la plus intéressante de ce composé s'est révélée être celle de l'addition d'un réactif du type R-O-X sur la double liaison selon l'équation :



Les réactions d'addition sont très caractéristiques des alcènes : la double liaison est rompue, deux groupes nouveaux venant se fixer pour conduire à un composé saturé.

Cette réaction entraînant la rupture d'une liaison C-C n'a pas lieu aussi aisément chez les alcanes mais cela n'est pas surprenant si on considère les différences des énergies de liaison. Compte tenu des valeurs de celles-ci la rupture de la "moitié" d'une double liaison C=C nécessite 63 Kcal alors que celle d'une liaison simple C-C nécessite 83 Kcal.

Des réactifs tels que les halogènes, les acides halogénés, les acides hypohalogéneux, l'eau, s'additionnent de façon courante sur les doubles liaisons d'alcènes pour conduire à des composés saturés.

On peut envisager dans ce cas une réaction ionique dans laquelle la rupture des liaisons constituées se produit de manière hétérolytique :

$$X \updownarrow : \; Y \rightarrow X^{+} + :Y^{-}$$

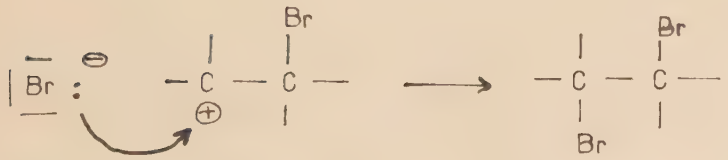
La plupart des réactions d'addition ionique ne paraissent pas être de simples transferts électroniques concertés à 4 centres procédant en une seule étape.

Il y a deux raisons importantes à celà :

1/ un tel mécanisme conduirait à une addition cis. Or de nombreux faits prouvent que le brome donne une addition trans.

2/ le deuxième argument découle du fait que lorsque la réaction est conduite en présence de réactifs capables de céder une paire d'électrons, elle fournit souvent un mélange de produits. L'intervention d'agents nucléophiles étrangers s'oppose à une seule étape. C'est d'ailleurs ce type de réaction secondaire qui présente pour nous un grand intérêt. Un mécanisme en deux stades schématisé mais rendant compte de la plupart des faits observés est proposé.

attaque électrophile

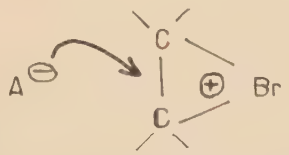


attaque nucléophile.

Le premier stade (qui met en jeu une attaque électrophile sur la double liaison et une coupure hétérolytique) donne lieu à la formation d'un ion bromure et d'un carbocation.

Ce cation est très réactif vis-à-vis des espèces susceptibles de fournir un doublet électronique et former une liaison covalente.

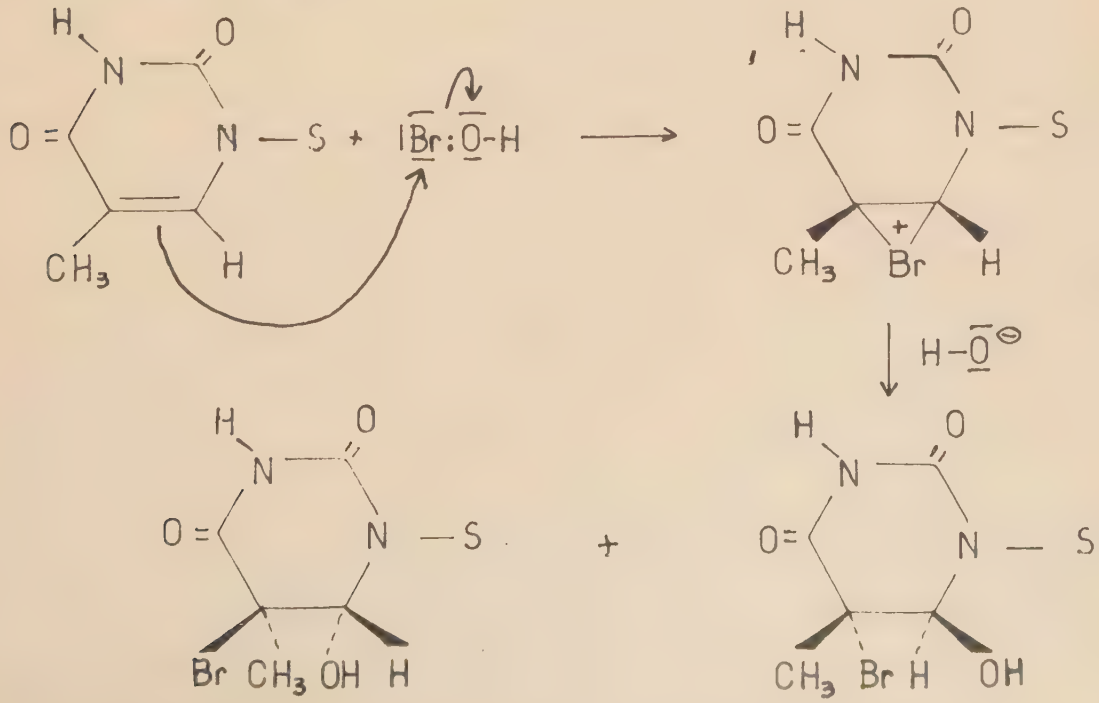
Pourquoi l'addition se fait-elle en trans ? afin d'expliquer cette stéréospécificité, l'hypothèse de la formation d'un intermédiaire cyclique dans lequel le brome serait lié aux deux atomes de carbone de la double liaison a été formulée. Cet ion ponté est appelé ion bromonium.



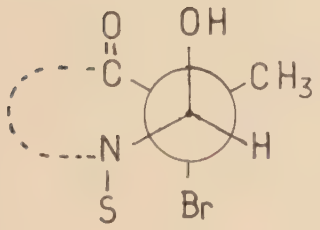
L'attaque de l'espèce nucléophile ne peut se produire alors que du côté opposé au pont d'où un produit d'addition trans.

De plus, on sait que l'addition des composés tels que Br-OH sur une cétone α,β éthylénique conduit à une addition trans du brome en α et du groupement hydroxyle en β => substituant OR en position 6.

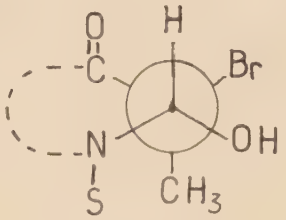
A partir de toutes ces données, on peut donc proposer le mécanisme réactionnel suivant :



On obtient donc ainsi deux diastéréoisomères trans 5S* 6S* et 5R* 6R* (nomenclature CAHN, INLOG, PRELOG) dont on pourra étudier les propriétés spectrales et que nous pouvons représenter selon le modèle de NEWMAN :



5R, 6R



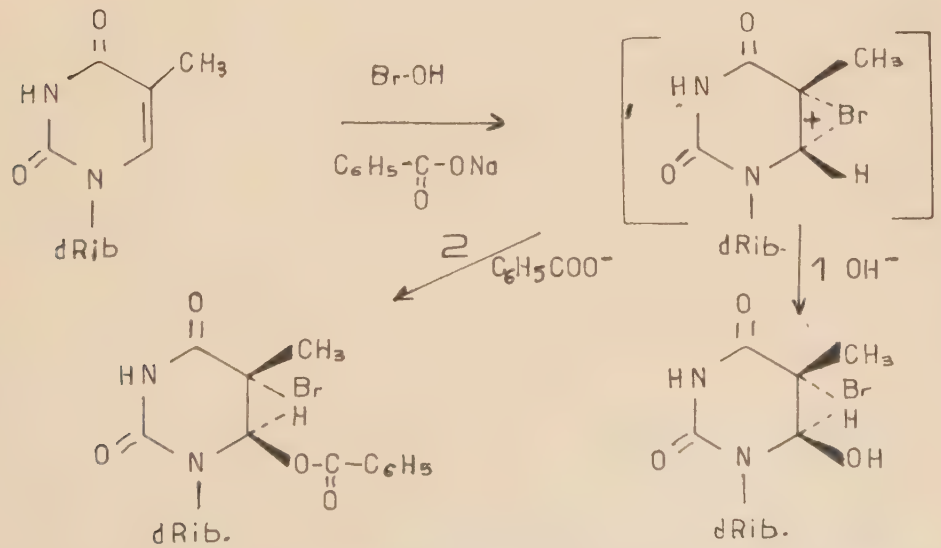
5S, 6S.

Intérêt des réactions secondaires.

La simple addition de brome en milieu aqueux conduit à la synthèse de bromohydrine trans de thymidine (17). Si dans le milieu réactionnel on ajoute du benzoate de sodium, deux types de réactions ont lieu :

1/ réaction principale : addition de Br-OH

2/ réaction secondaire : addition de Br-O-CO-C_6H_5.



Br-5, Bz-6, Dihydro-5,6 THYMIDINE

Br-5, OH-6, Dihydro-5,6 THYMIDINE

Cette réaction secondaire conduit au composé qui présente pour nous le plus d'intérêt. Aussi une méthode de préparation plus quantitative a dû être recherchée et la mise au point a été délicate.

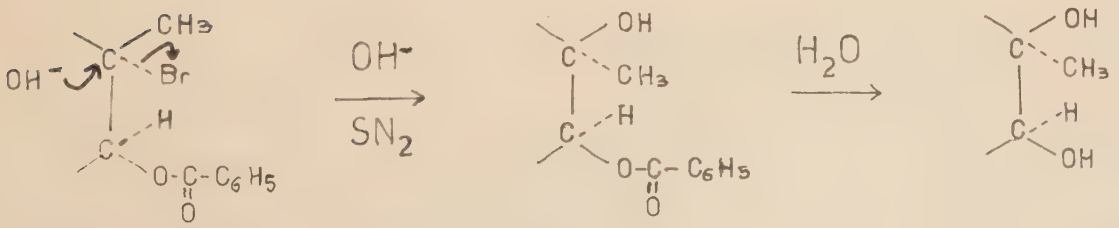
Principe.

La réaction s'effectue par action du brome en présence de benzoate de sodium à température ambiante, sur la thymidine dans un solvant formé de dioxanne et d'eau en proportion rigoureuse. En effet, une quantité judicieuse de dioxanne doit être ajoutée à l'eau de manière à éviter les réactions de substitution du brome par le groupement hydroxyle.(La conservation du brome en position 5 est importante car les nucléosides halogénés sont très intéressants dans le domaine des inhibiteurs).

Cette addition sur la double liaison se manifeste par une diminution de l'absorption UV à 266 nm due au groupement chromophore du carbonyle conjugué avec la double liaison 5,6 éthylénique, et par le déplacement vers les hautes fréquences dans le spectre infra-rouge de l'absorption de la bande $\nu C{=}O$ de la fonction carbonyle en position 4.

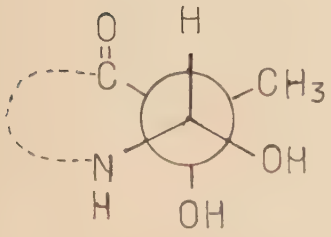
De plus la présence de l'atome de brome en position 5 est confirmée par le déplacement important vers les champs faibles du singulet correspondant au signal de résonance magnétique nucléaire des protons du groupement méthyle.

On sait que l'addition des composés bromés tels que BrOH sur une cétone α éthylénique conduit à une addition en trans du brome en α et du groupement OH en β. Le chauffage à reflux dans un mélange de pyridine et d'eau des deux bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6' thymidine trans permet la substitution du brome par le nucléophile OH^- selon un mécanisme SN_2 (inversion de configuration).

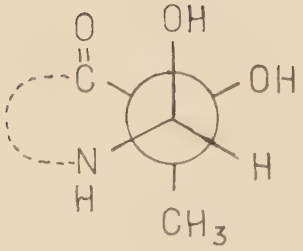


trans cis cis

et l'hydrolyse du groupement ester, et conduit ainsi aux deux glycols cis de thymidine correspondant.

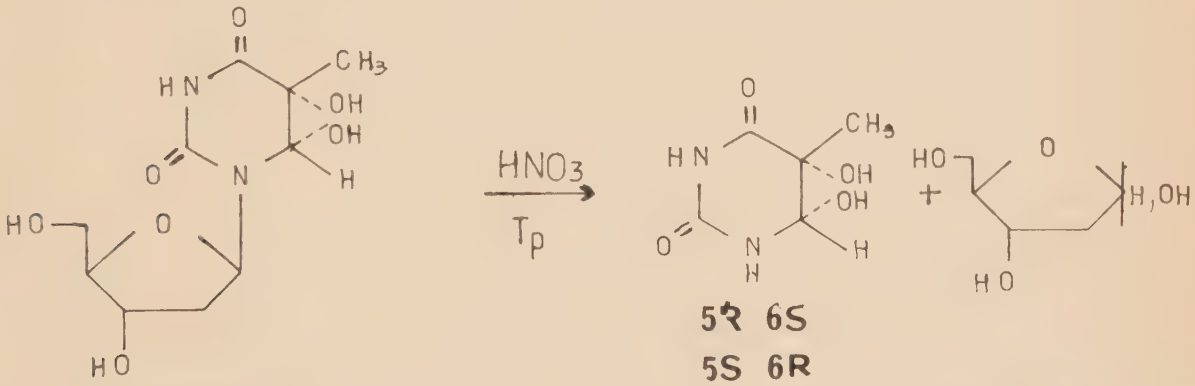


5 R 6 S



5 S 6 R

Le chauffage de ces deux composés en présence d'acide nitrique selon la méthode de DUSCHINSKY & FOX (26) donne respectivement par rupture de la liaison N-glycosidique les deux formes énantiomères de configuration cis des glycols de thymine c-a-d $5R^*$, $6S^*$ et $5S^*$, $6R^*$.



5 R 6 S
5 S 6 R

Ces deux glycols présentent les mêmes caractéristiques spectroscopiques et chromatographiques que les diols $5R^*$, $6S^*$ et $5S^*$, $6R^*$ préparés de manière stéréospécifiques par oxydation de la thymidine par le permanganate de potassium à pH 7,5 (16).

On peut montrer que ces composés possèdent toujours une structure nucléosidique.

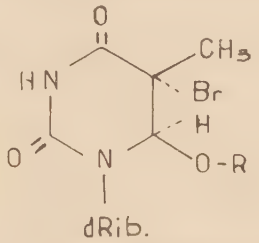
- ils se révèlent par les réactifs caractéristiques des groupements désoxyribosidiques tels que la cystéine (hydrolyse acide du groupement osidique , ouverture du cycle et formation d'un complexe rose avec la cystéine).

De plus, la réaction négative que donnent ces composés avec le réactif au métapériodate permet d'attribuer la configuration furanique du cycle osidique. En effet, ce réactif donne un test positif (blanc sur fond bleu) si la molécule possède deux groupements hydroxyles vicinaux. Le désoxyribose ne peut donner une telle réaction que s'il est sous forme pyranique.

Synthèse BROMO-5, ALKOXY-6, DIHYDRO-5,6, THYMIDINE.

Il serait intéressant de savoir si les propriétés dues à la rotation restreinte de la base autour de la liaison glycosidique, grâce à la substitution en 6 par un groupement volumineux, sont fonction de l'encombrement stérique du groupement ou simplement fonction de la présence d'un groupement. Dans ce but, il nous a paru intéressant de synthétiser une série de molécules, de structure voisine des bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine, dont le groupe substituant est de plus en plus volumineux. C'est pour cela que nous avons choisi des groupes de type O-R où R est successivement un méthyle, un éthyle, un n-butyle, un iso-pentyle.

Nous obtiendrons donc une série de molécules de type :



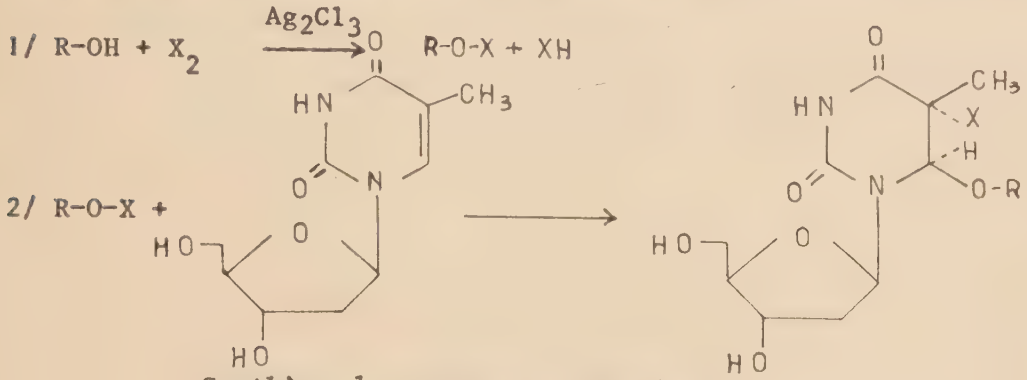
qui seront préparées d'une manière très différente mais selon le même mécanisme. Nous aboutirons donc, par addition de chaque réactif R-O-Br sur la double liaison, aux deux diastéréoisomères trans.

Principe.

Cette synthèse a été réalisée par adaptation de la méthode de DUSCHINSKY et coll. (26) sur le fluorouracile au cas de la thymine désoxyriboside.

Cette synthèse s'effectue en deux étapes :

La première consiste à former par action de l'halogène sur un alcool, en présence de carbonate d'argent, l'hypohalite d'alkyle R-O-X. La deuxième correspond à l'addition sur la double liaison 5,6 du cycle pyrimidique de cet hypohalite selon le mécanisme proposé précédemment :

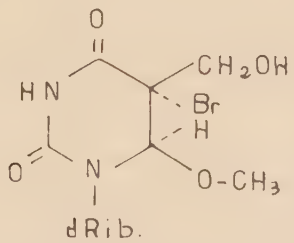


Synthèse de composes apparentes.

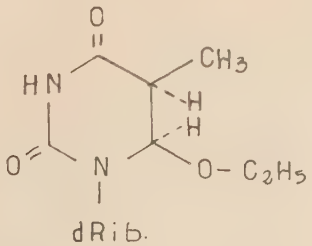
Les études de CHAE en 1972 (9) ont montré qu'une substitution des pyrimidines en position 5 pouvait présenter elle-aussi un intérêt biochimique. Pour que notre étude soit la plus complète possible, nous avons synthétisé des molécules voisines des analogues de thymidine, dont les modifications se situent en 5 et nous étudierons leurs propriétés biochimiques.

Deux types de molécules ont retenu notre attention :

- *Bromo-5 hydroxyméthyl-5 méthoxy-6 dihydro-5,6 désoxyuridine.*



-*Ethoxy-6 dihydro-5,6 thymidine*



La méthode de synthèse du 1er composé est identique à celle des Bromo-5 Méthoxy-6 Dihydro-5,6 thymidine. La molécule de base est l'hydroxyméthyl-5 désoxyuridine, synthétisée selon la méthode de BAKER (3). Le deuxième dérivé est obtenu après réduction du brome par de l'hydrogène sur le Bromo-5 Ethoxy-6 DH-5,6 thymidine.

CHAPITRE II

CARACTERISATION des COMPOSES SYNTHETISES

I.- ETUDE des SPECTRES d'ABSORPTION ULTRAVIOLETTE et INFRA-ROUGE

L'étude des spectres d'absorption ultraviolette des composés synthétisés permet de prouver la saturation de la double liaison 5,6 éthylénique.

En effet, dans la thymidine, la présence de deux chromophores conjugués C=O et C=C conduit à une absorption importante de la molécule à 266 nm. Le coefficient d'extinction a pu être déterminé :

$$\varepsilon_{266} = 12.000 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

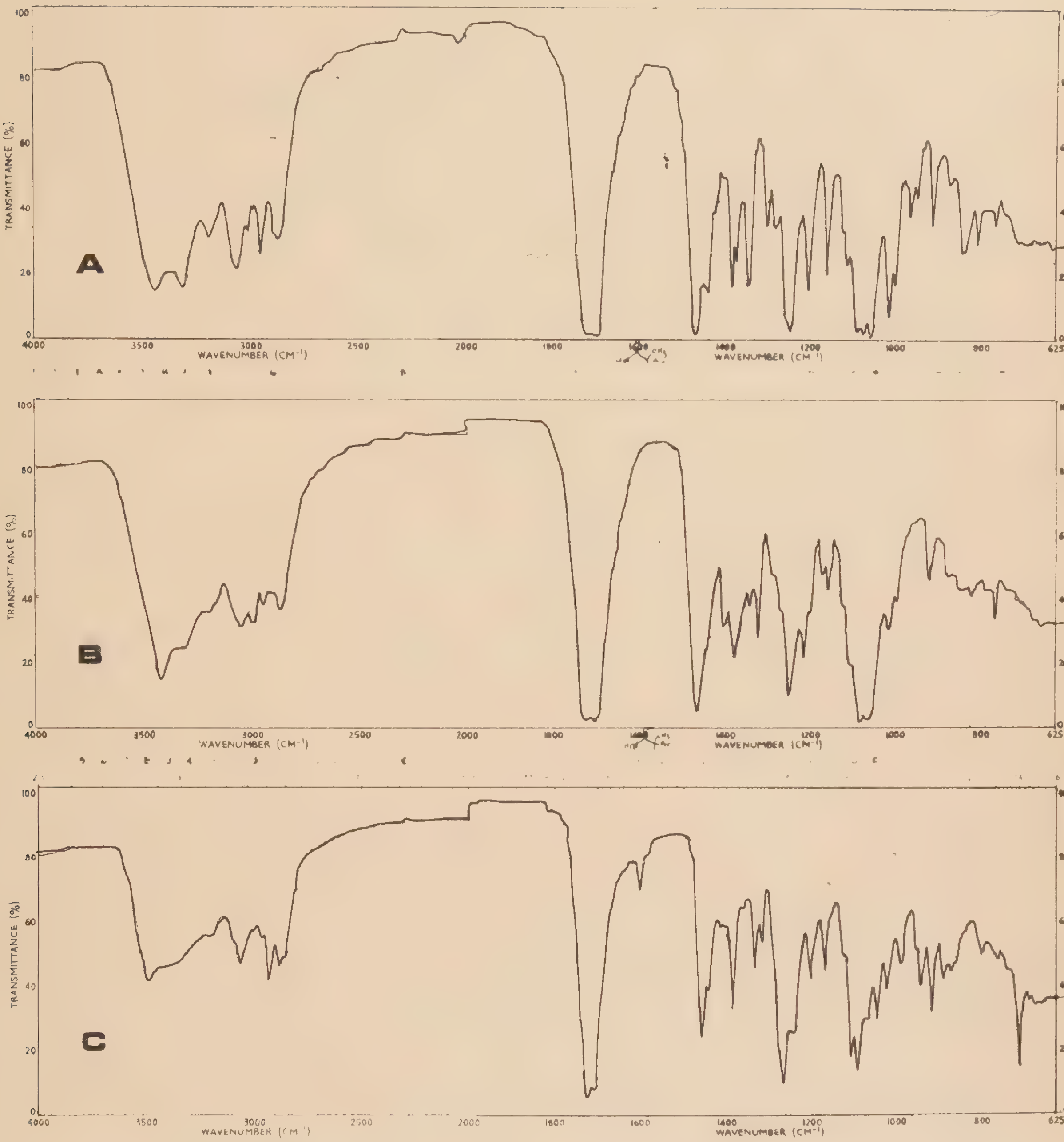
En ce qui concerne les molécules synthétisées, l'absorption UV entre 200 et 300 nm est faible. Le coefficient d'extinction moléculaire à 266 nm varie de 750 à 900 L M^{-1} cm^{-1} selon les molécules.

D'autre part, en ce qui concerne les bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine, la substitution en 6 par le groupement benzoyloxy a apporté un nouveau groupement chromophore à la molécule. Les données théoriques de l'absorption de ce chromophore (27) montrent une absorption maximum (ε_{max} = 8700) pour une longueur d'onde λ = 224 nm. Les valeurs expérimentales λ = 224 nm, ε_{max} = 6000 L M^{-1} cm^{-1} , permettent d'affirmer la présence de ce groupe sur la molécule.

L'apport de la spectroscopie UV est plus important dans le cas de telles molécules mais reste cependant limité. L'étude des spectres IR (Fig. 1) a apporté des résultats plus probants quant à la nature des composés formés. La comparaison entre les spectres de thymidine et ceux des analogues synthétisés a permis de caractériser certains pics avec précision.

Les bandes de vibration d'élongation des groupes OH (3300, 3500 cm^{-1}) CH_3 (2840-2870 cm^{-1}) ; C-O- (alcool primaire 1000-1100 cm^{-1}) ; alcool secondaire (1050-1150 cm^{-1}) et C-O-R (1240-1270 cm^{-1}) ont été aisément mises en évidence. En ce qui les concerne, la seule différence entre la thymidine et les analogues réside en une augmentation de l'intensité des bandes ν_{C-O-R} ester et ν_{CH_3} ce qui prouve qu'un groupe -OR s'est fixé.

SPECTRES INFRA-ROUGE



[illegible]

Des modifications plus importantes se situent au niveau des bandes de vibration d'élongation $\nu_{=CH}$ (3030 cm^{-1}) $\nu_{C=C}$ (1660 cm^{-1}) et $\nu_{C=O}$ (1700 cm^{-1}). $\nu_{C=C}$ et $\nu_{=CH}$ disparaissent tandis que $\nu_{C=O}$ est déplacé vers les plus hautes fréquences (1720 cm^{-1}). De ces résultats, on déduit facilement que la double liaison est saturée et que la conjugaison a disparu.

En ce qui concerne les composés benzoylés des bandes supplémentaires dues au noyau benzénique apparaissent. Il s'agit de bandes $\nu_{=CH}$ (3000 cm^{-1}) et $\nu_{C=C}$(1600 cm^{-1}).

On peut aussi attribuer des bandes dues aux vibrations de déformation dans le plan, de type cisaillement : les pics de vibration de déformation symétrique δs dans des groupes méthyles (1380 cm^{-1}), asymétrique δas dans des groupes méthyles et méthylènes (1465 cm^{-1}).

Pour les composés aromatiques, une bande importante due à la déformation du cycle benzénique (δ' cycle 712 cm^{-1}) est particulièrement remarquable.

II - ETUDE DES SPECTRES DE RMN.

Si les spectres UV et IR de deux diastéréoisomères sont identiques, il n'en est pas de même en ce qui concerne les spectres de RMN. Nous avons affaire à deux configurations, par conséquent les environnements des protons, sont différents.

Il est particulièrement intéressant de noter que les diastéréoisomères levogyres ont tous des spectres très voisins pour des protons identiques et d'ailleurs il en est de même pour les diastéréoisomères dextrogyres. (figure 2 à 7).

Les différences les plus notables entre deux diastéréoisomères se situent au niveau des protons $H_{1"}$ $H_{2'}$ et $H_{2"}$ du sucre et H_6 de la base.

Pour les diastéréoisomères dextrogyres H_1, est très nettement déblindé (0,45 ppm) il en est de même pour H_6 (0,16 ppm) sauf dans le cas des bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine ($H\text{-}6^{(-)}$ plus déblindé 0,09 ppm).

Composés \ Protons		$H_{1'}$	H_6	$H_{3'}$	$H_{4'}$	$H_{5'}$	$H_{2'}$	CH_3	AUTRES
Bromo-5, Méthoxy-6, Dihydro-5,6 Thymidine	d	6,12	5,18	4,34	3,87	3,76	2,24	1,92	CH_3 3,52
	l	5,66	5,02	4,43	3,87	3,76	2,62 2,14	1,94	3,57
Bromo-5, Ethoxy-6, Dihydro-5,6 Thymidine	d	6,08	5,26	4,37	3,88	3,75	2,25	1,93	CH_2 3,88 CH_3 1,13
	l	5,64	5,10	4,36	3,90	3,78	2,23 2,58	1,93	3,81 1,18
Bromo-5, Butoxy-6, Dihydro-5,6 Thymidine	d	6,02	5,19	4,32	3,80	3,74	2,22	1,91	OCH_2 3,80 CH_2 1,45 CH_3 0,88
	l	5,67	5,08	4,43	3,82	3,78	2,22 2,53	1,93	3,82 1,44 0,90
Bromo-5, Isoamyloxy-6, Dihydro-5,6 Thymidine	d	6,03	5 20	4,33	3,88	3,74	2,29	1,92	OCH_2 3,86 CH_2 1,45 $2CH_3$ 0,89
	l	5,60	5 02	4,41	3,90	3,75	2,20 2,52	1,91	3,86 1,48 0,88
Bromo-5, Benzoyloxy-6, Dihydro-5,6 Thymidine	d	6,23	6,78	4,24	3,72	3,58	2,08	1,88	2H(Bz) 7,87 3H(Bz) 7,55
	l	6,14	6,87	4,26	3,86	3,78	2,40 2,08	1,88	7,91 7,58
Bromo-5, Acétoxy-6, Dihydro-5,6 Thymidine	d	6,24	6,51	4,27	3,78	3,64		1,95	CH_3 2,12
	l	6,01	6,54	4,29	3,82	3,73		1,93	2,13
Bromo-5, Hydroxymethyl-5 Méthoxy-6, Dihydro-5,6, desoxy-2' Uridine	d	6,14	5.18	4,33	3,88	3,76	2,24	—	CH_2OH 4,10 CH_3 3,58

Tab.1 : Tableau des deplacements chimiques en RMN.

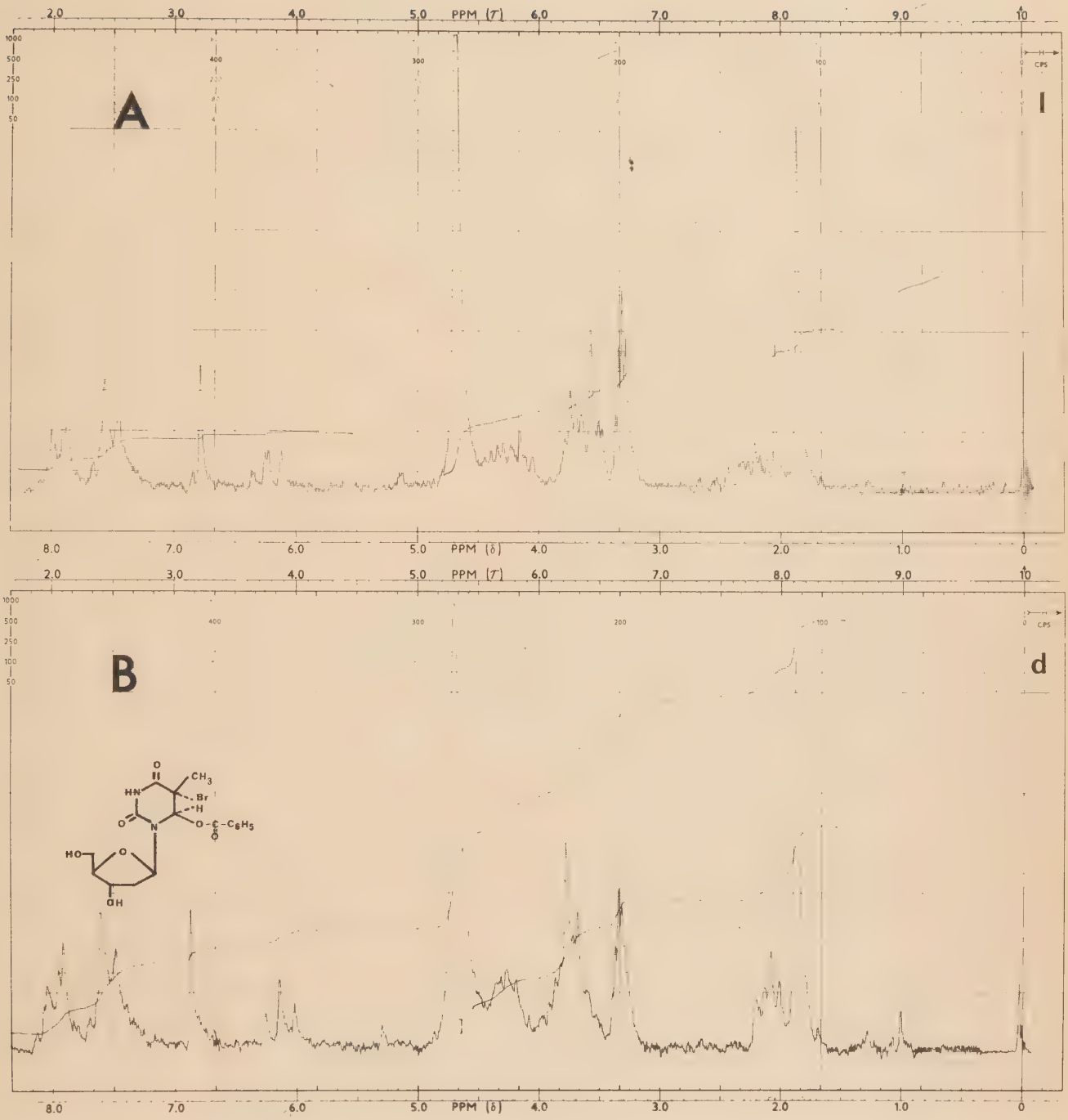


Fig. 2 : Spectre de RMN des bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine (d) et (l)

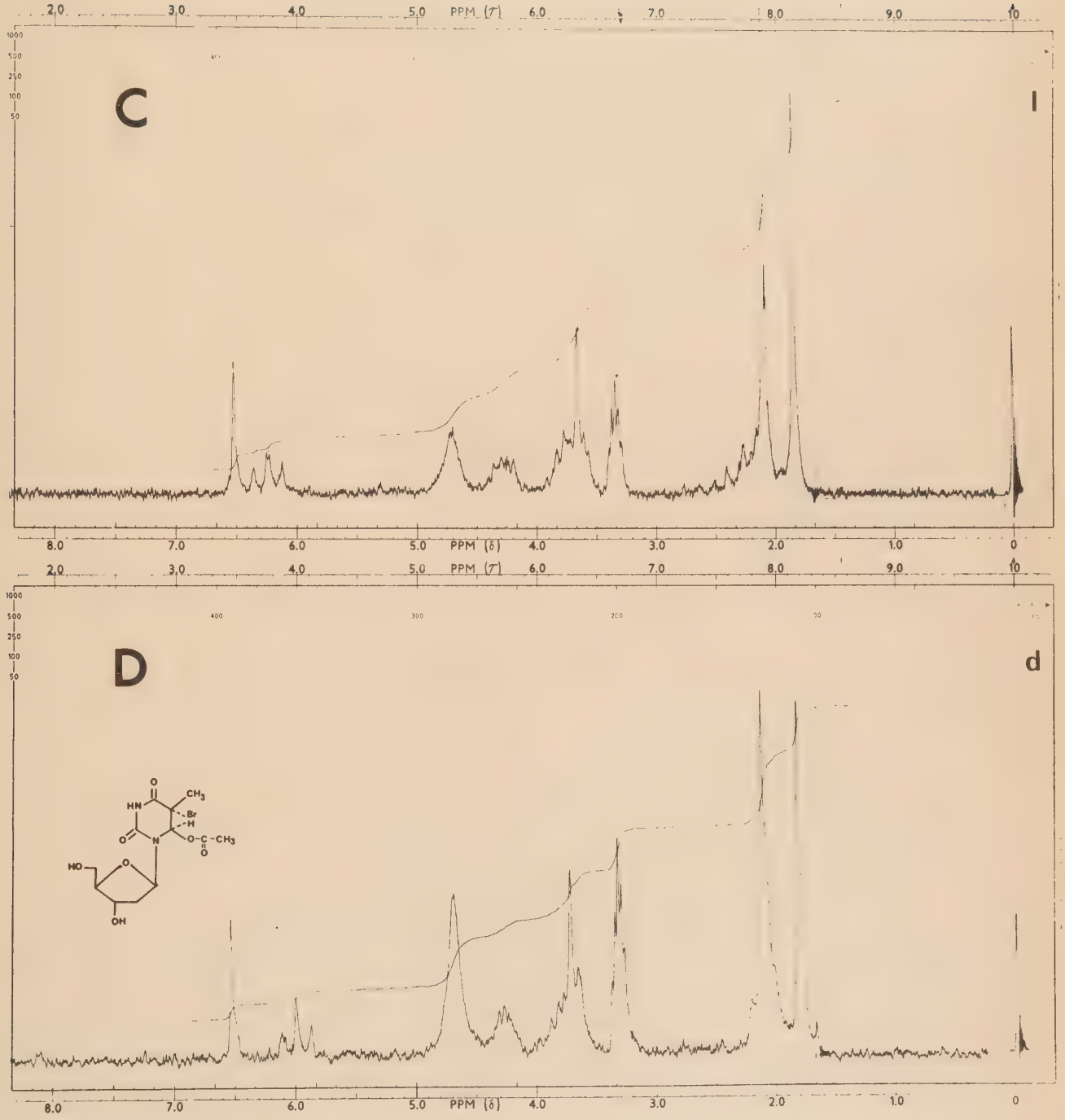


Fig. 3 : Spectre RMN des bromo-5 acétoxy-6 dihydro-5,6 thymidine (d) et (l)

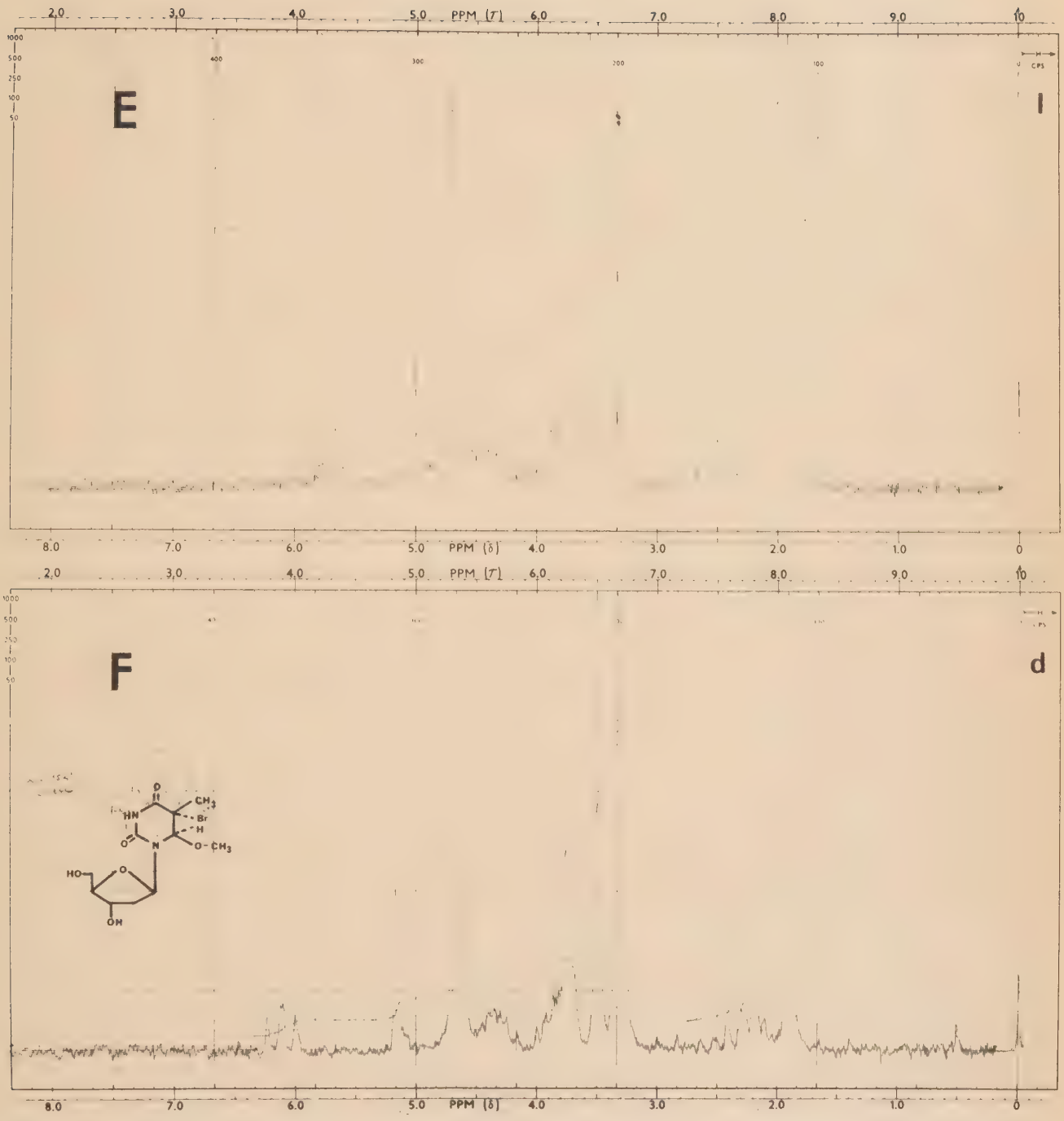


Fig. 4 : Spectre RMN des bromo-5 méthoxy-6 dihydro-5,6 thymidine (d) et (l)

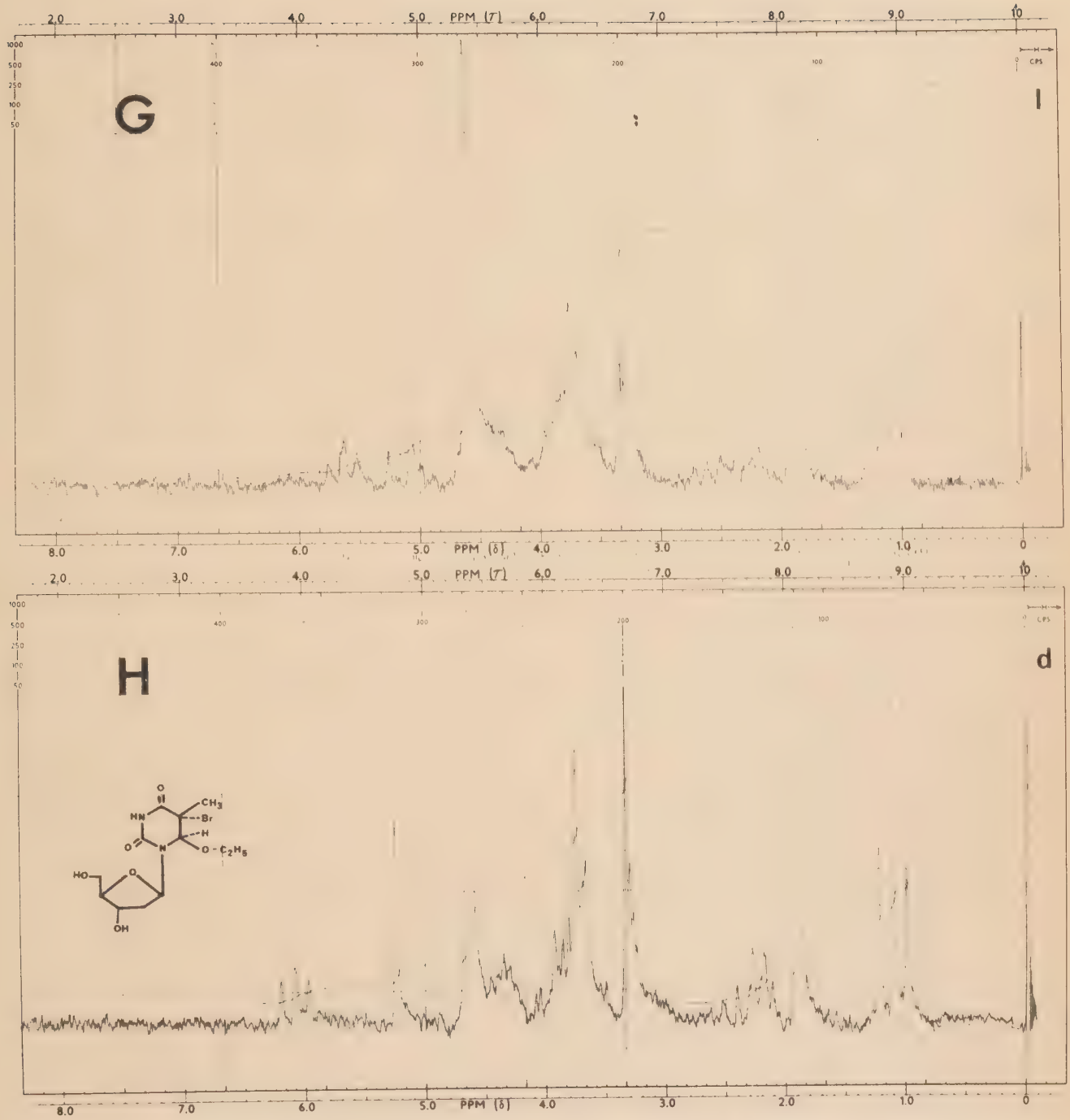


Fig.5 : Spectre RMN des bromo-5 ethoxy-6 dihydro-5,6 thymidine (d) et (l)

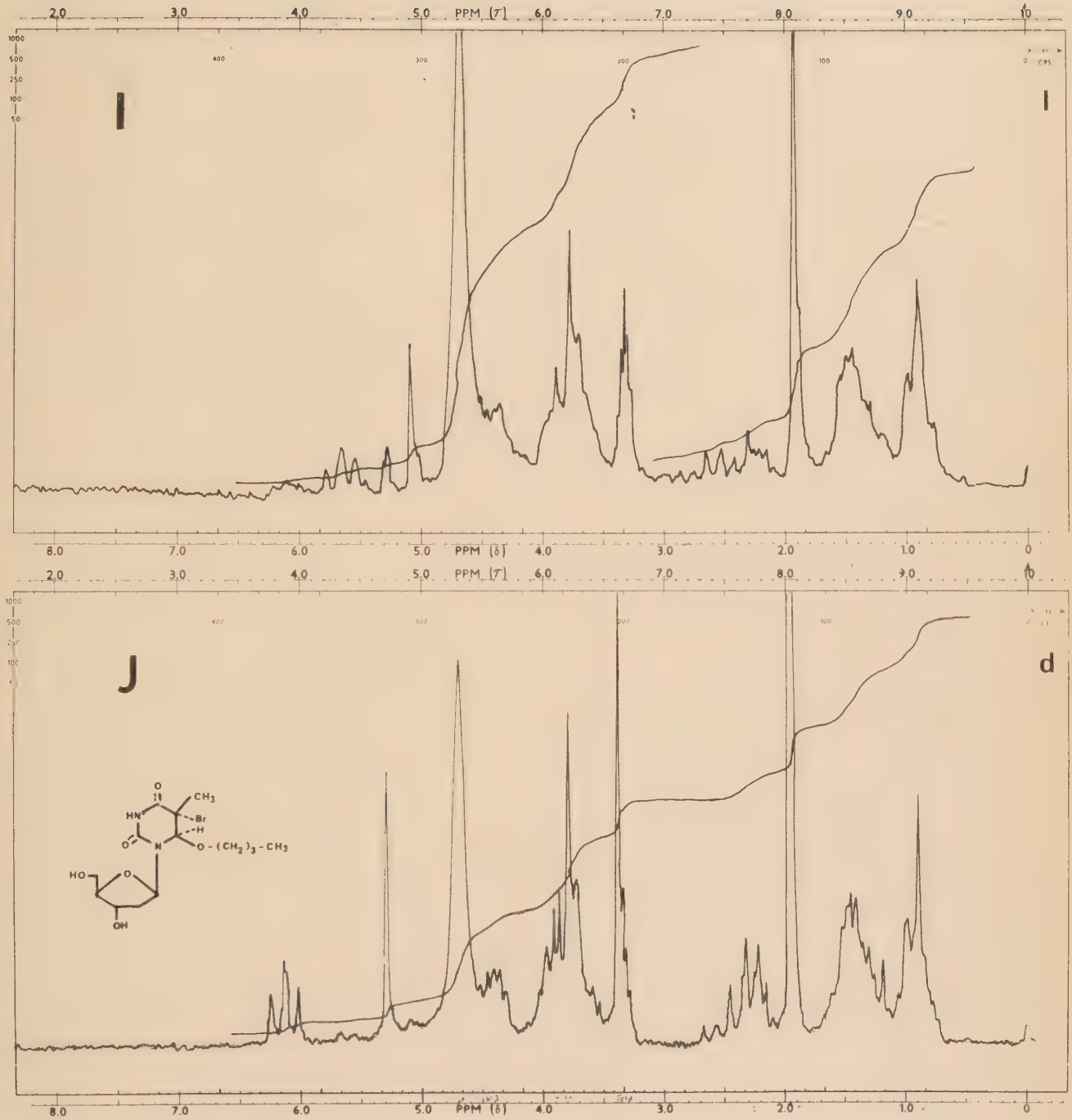


Fig. 6 : Spectre RMN des bromo-5 butoxy-6 dihydro-5,6 thymidine (d) et (l)

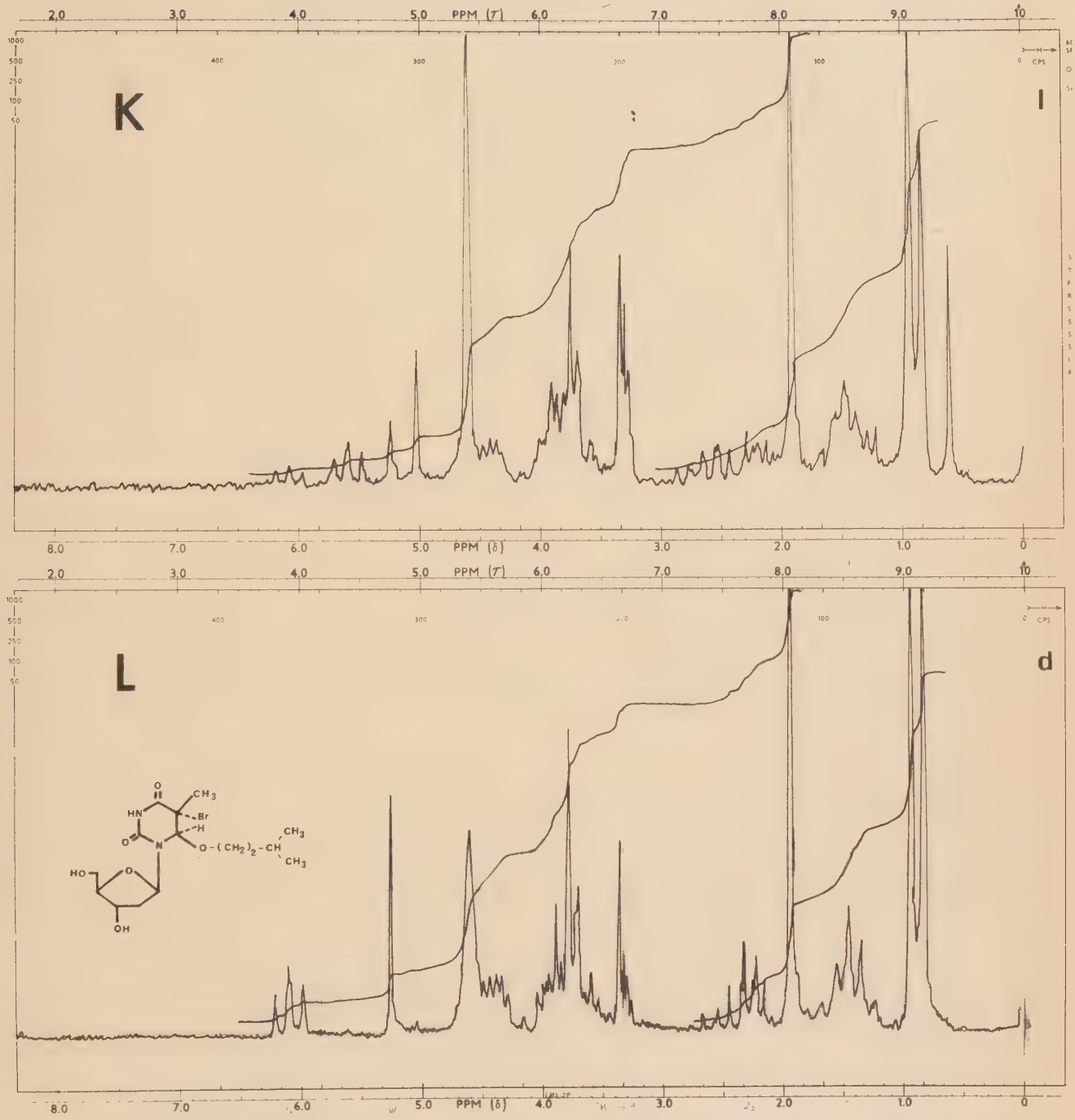


Fig. 7 : Spectre RMN des bromo-5 isoamyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine (d) et (1)

La caractéristique la plus intéressante se situe au niveau des protons $H_{2'}$ et $H_{2''}$. Dans le cas des composés dextrogyres, les massifs correspondant à ces deux protons sont imbriqués l'un dans l'autre ce qui tend à préciser que ces deux protons sont équivalents ou presque. Dans le cas des composés lévogyres, les 2 massifs sont très nettement séparés ($\delta \sim 2,6$; $\delta \sim 2,10$) ce qui montre que ces protons sont "vus" de la manière très différente par les autres protons de la molécule (tableau de déplacements chimiques).

Ces résultats montrent que parallèlement à la différence de configuration au niveau des carbones 5 et 6, il existe une différence de conformation des diastéréoisomères autour de la liaison glycosidique.

ETUDE DES SPECTRES DE MASSE.

Du fait de la saturation de la double liaison 5,6 le caractère aromatique de la thymidine a disparu. L'ion moléculaire, déjà faible pour la thymidine, n'est pas, ou peu visible car la molécule est beaucoup plus fragile. Les liaisons 5,6 et leur voisines sont les points de fragilité à partir desquels ont lieu les principales ruptures. Les substituants influeront beaucoup sur la fragmentation.

Tous les composés de la série présentent un même type de fragmentation, et en particulier pour le sucre. C'est d'ailleurs à son niveau qu'elle est la plus importante et que le nombre d'ions est le plus grand. Les bases présentent le même type de fragmentation mais la différence réside dans le type de réaction prépondérante (Cf. spectres et schémas pages suivantes).

En ce qui concerne les bromo-5 alkoxy-6 dihydro-5,6 thymidine, la rupture principale est celle de la liaison glycosidique, la base perdant ensuite soit $Br^{\cdot}$ soit $^{\cdot}OR$ puis se dégrade jusqu'au stade $HNCO^{+\cdot}$ à m/e = 43.

Dans le cas des bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine, la stabilité de la liaison C-N est plus grande que celle du brome en 5. On note donc la grande importance de la dégradation de la base, toujours liée au sucre par perte de $Br^{\cdot}$ puis C_6H_5-COOH. Quant à la base, libérée de sa liaison glycosidique, elle se dégrade jusqu'au stade de l'ion $HNCO^{+\cdot}$ à m/e = 43.

A partir des données de l'ordinateur et de la liste des ions obtenus au cours de chaque dégradation, on a pu établir un schéma de fragmentation de tous ces analogues de nucléosides.

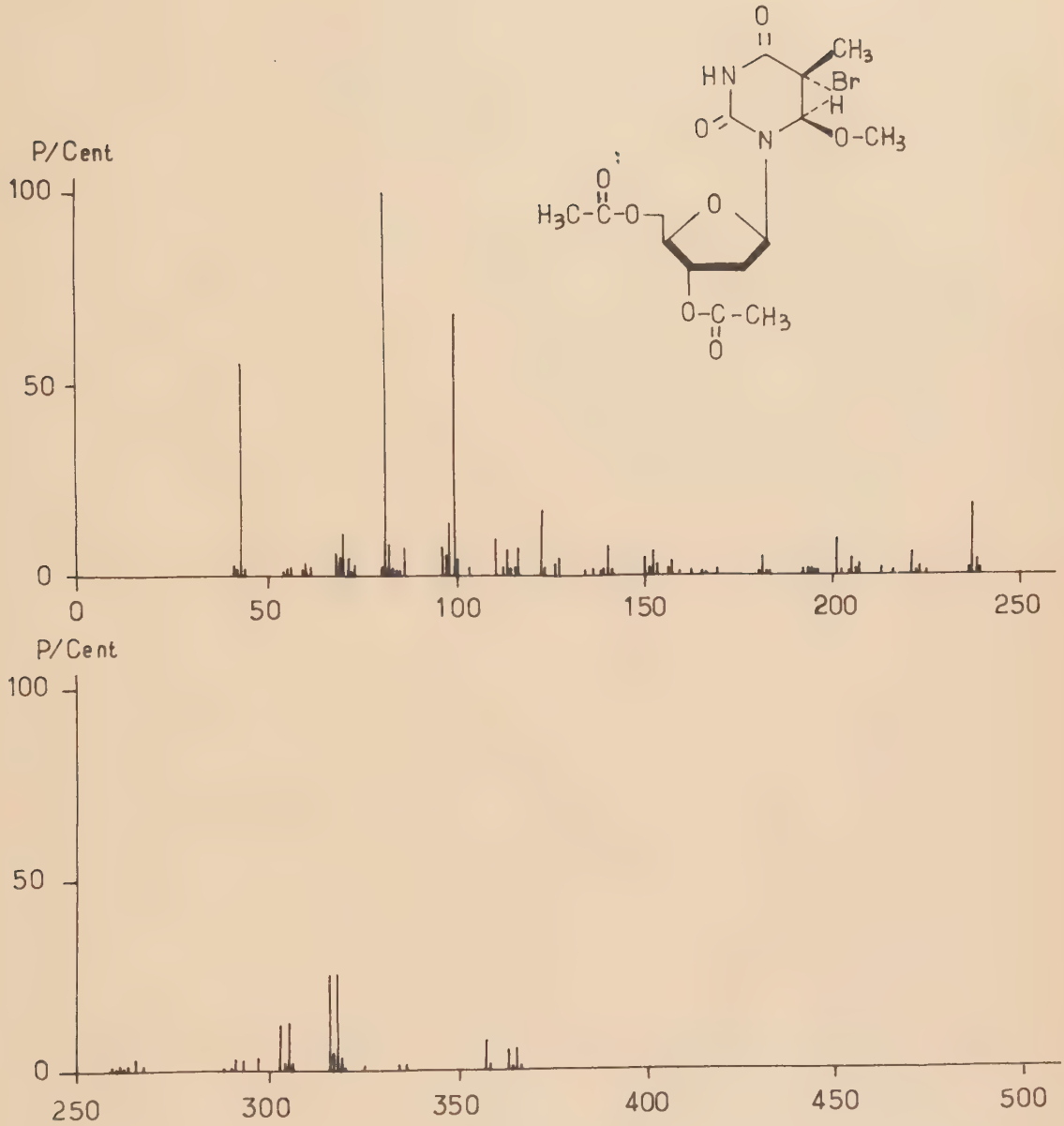


Fig. 8 : Spectre de masse du bromo-5 méthoxy-6 dihydro-5,6 diacétyl-3',5' thymidine

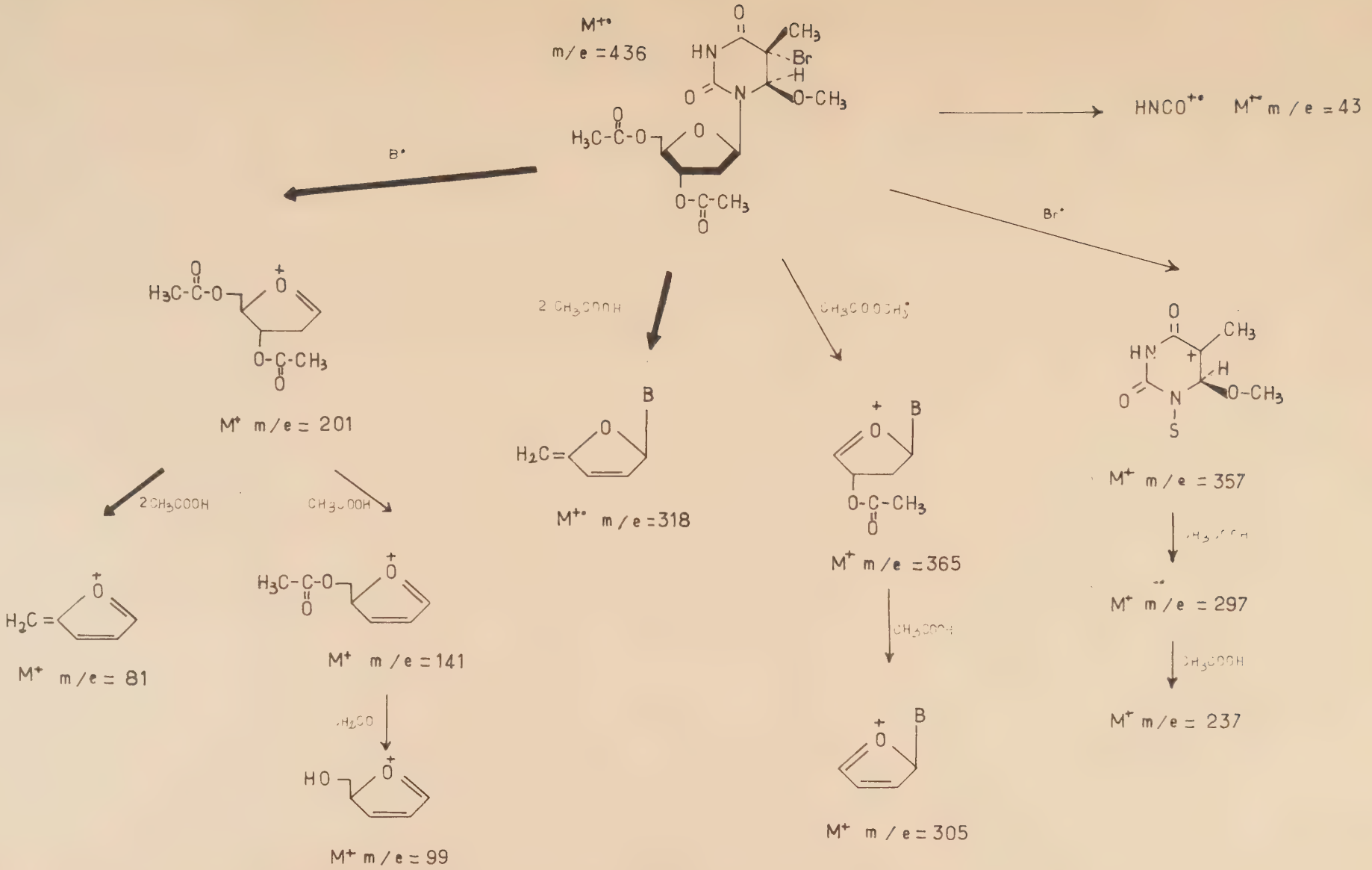


Fig. 9 : Schéma de dégradation du bromo-5 méthoxy-6 dihydro-5,6 diacétyl-3',5' thymidine

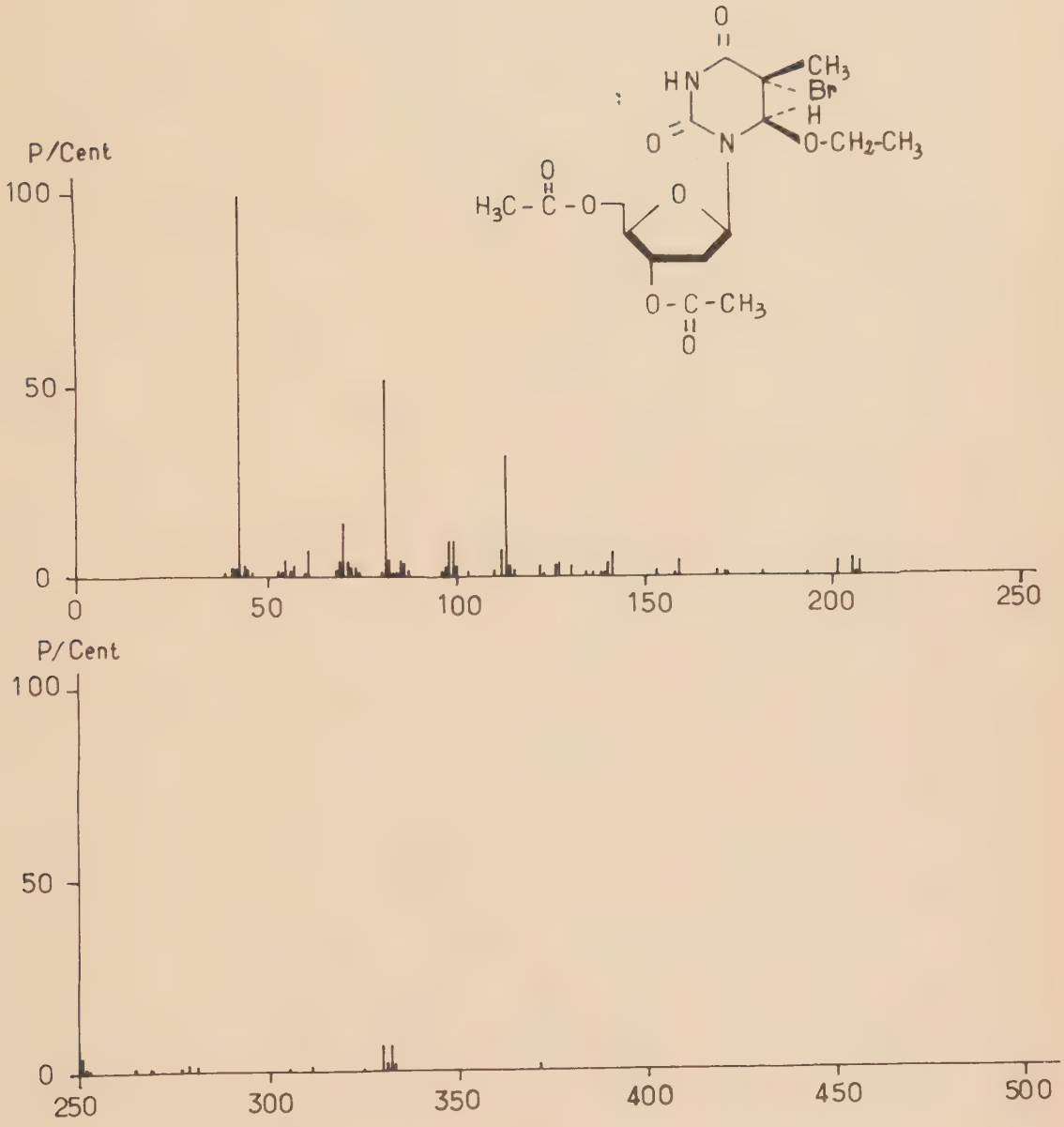


Fig. 10 : Spectre de masse du bromo-5 éthoxy-6 dihydro-5,6 diacétyl-3',5' thymidine

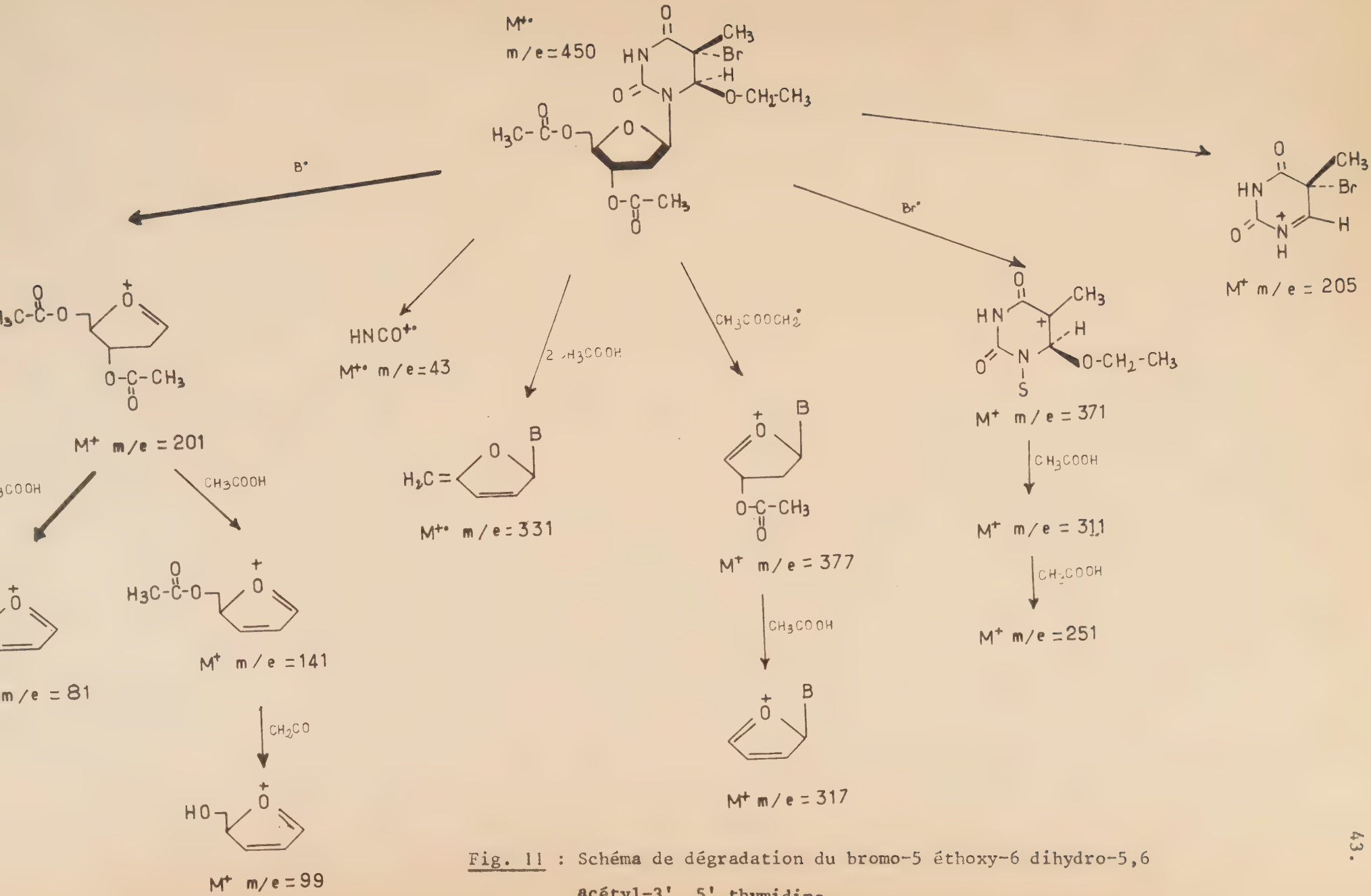


Fig. 11 : Schéma de dégradation du bromo-5 éthoxy-6 dihydro-5,6 acétyl-3', 5' thymidine

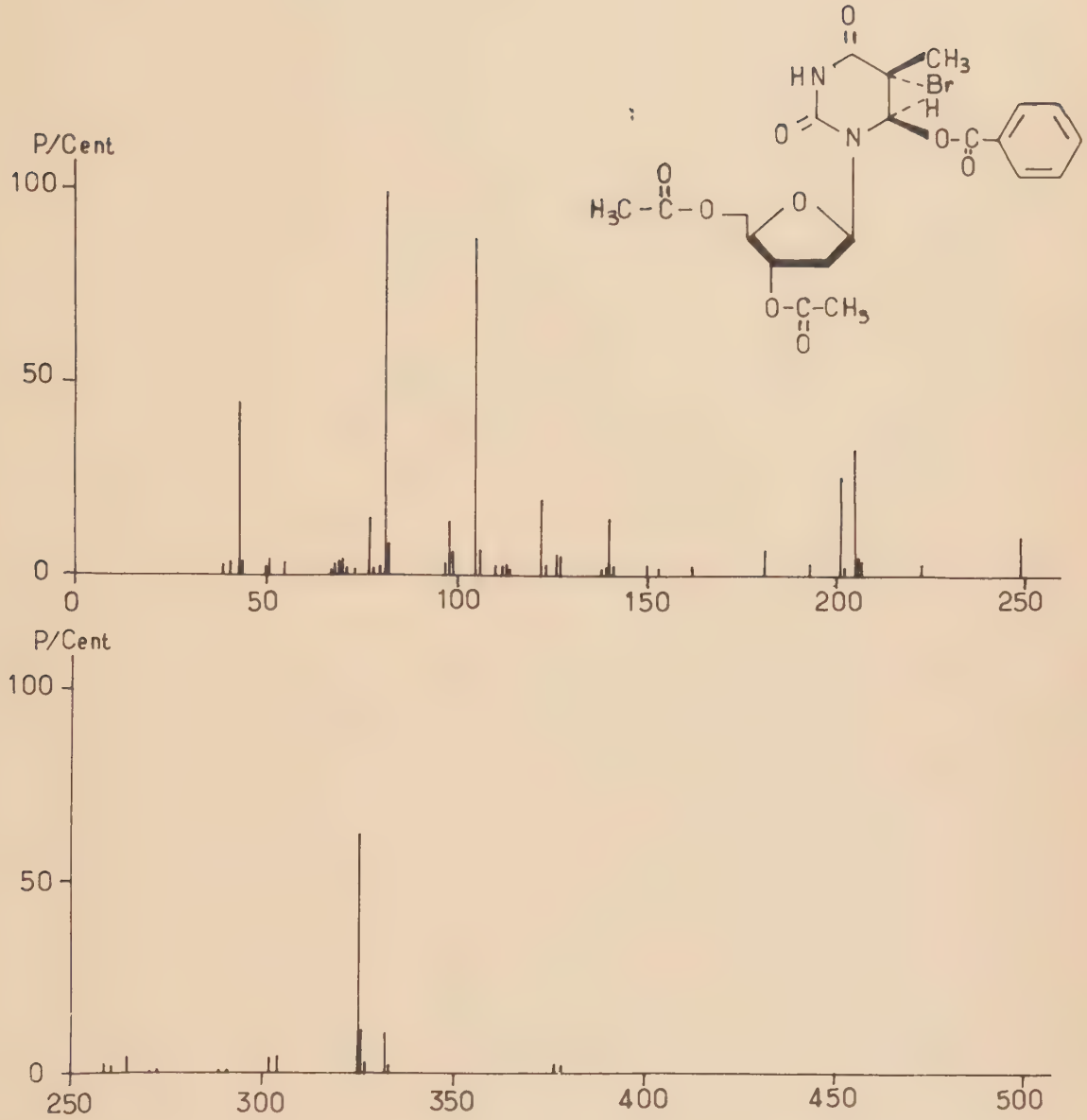


Fig. 12 : Spectre de masse du bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 diacétyl-3',5' thymidine

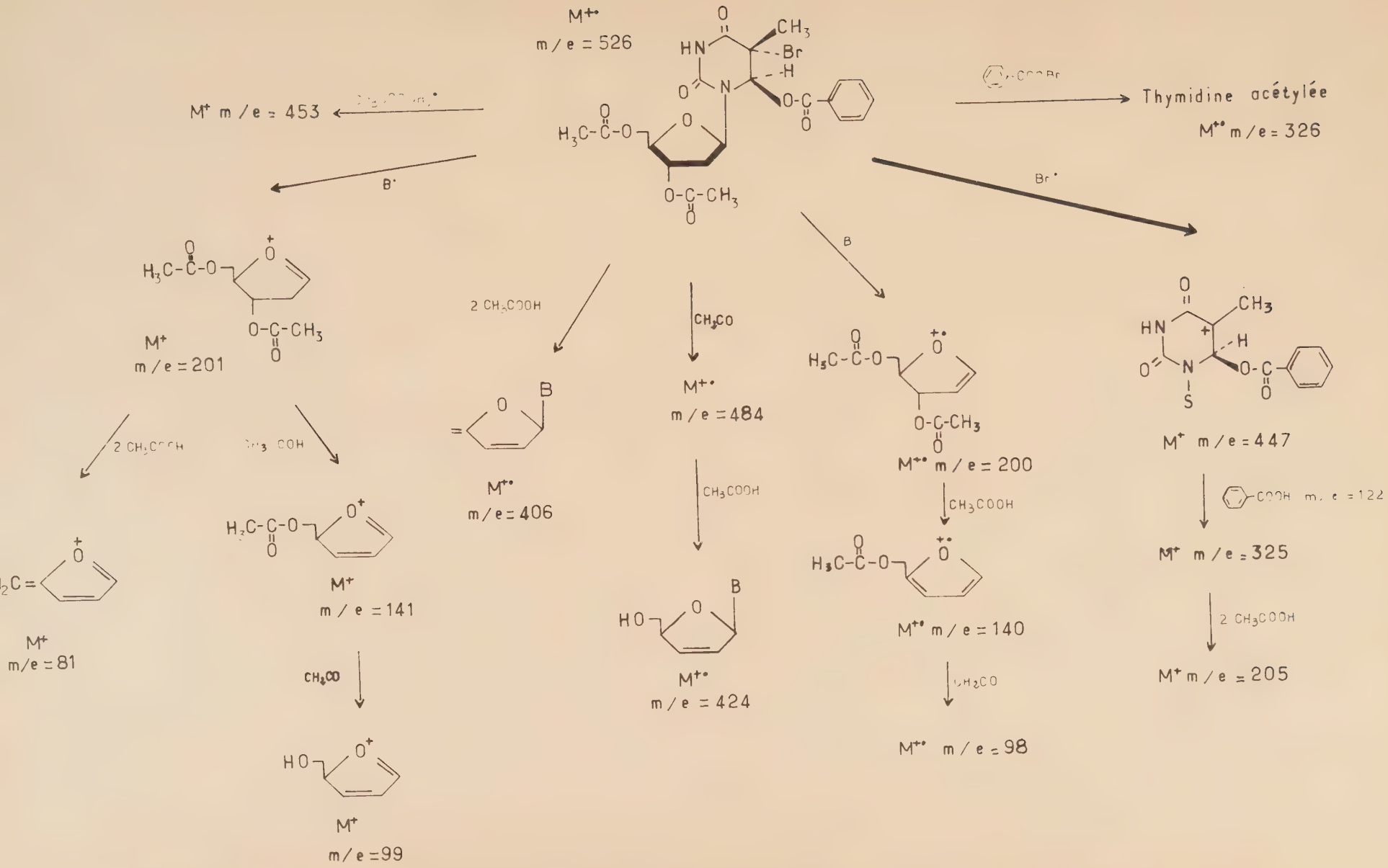


Fig. 13 : Schéma de dégradation du bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 diacétyl-3',5' thymidine

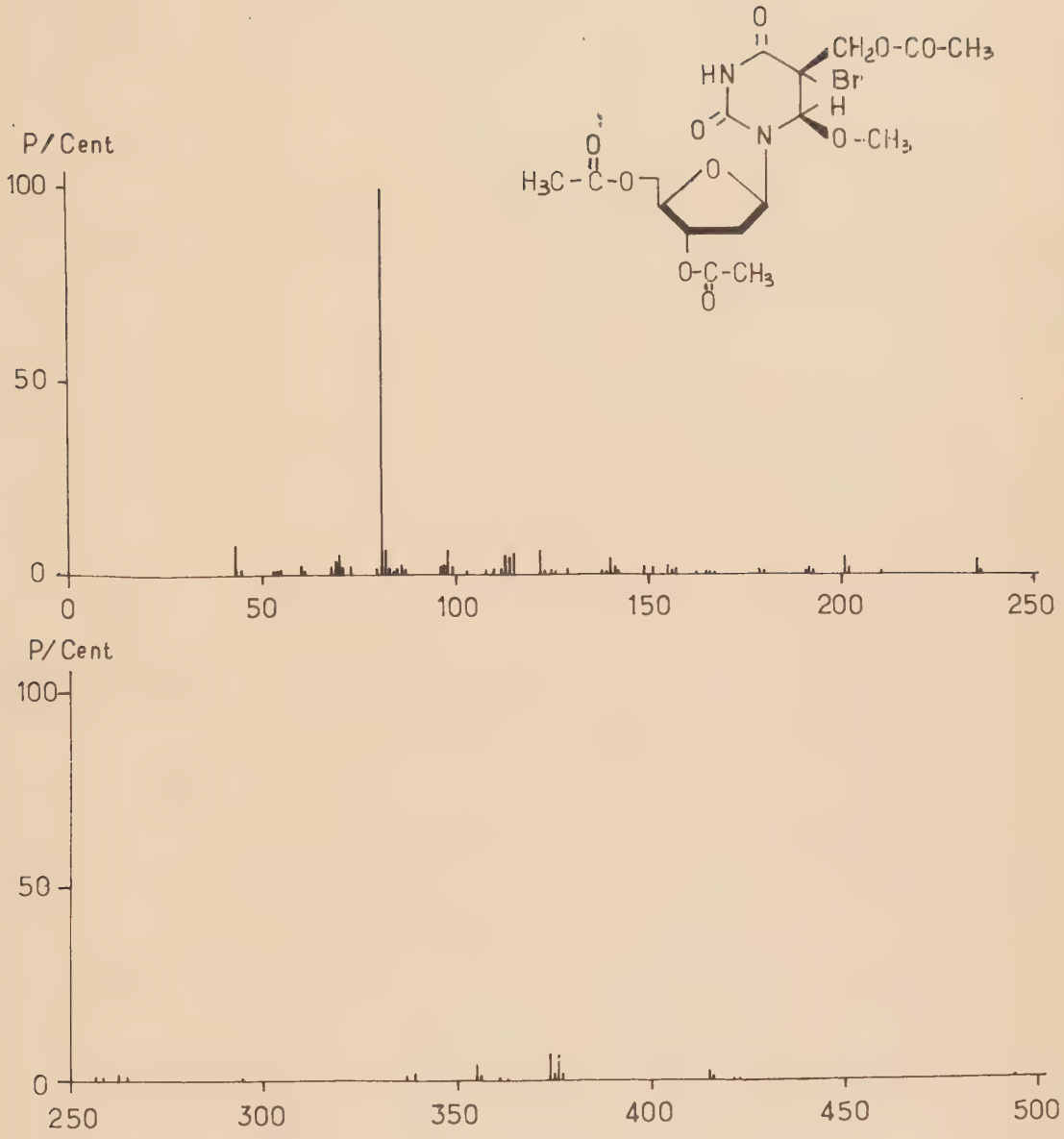


Fig.14 : Spectre de masse du bromo-5 hydroxyméthyl-acétylé-5 méthoxy-6 dihydro-5,6 diacétyl-3',5' désoxy-uridine

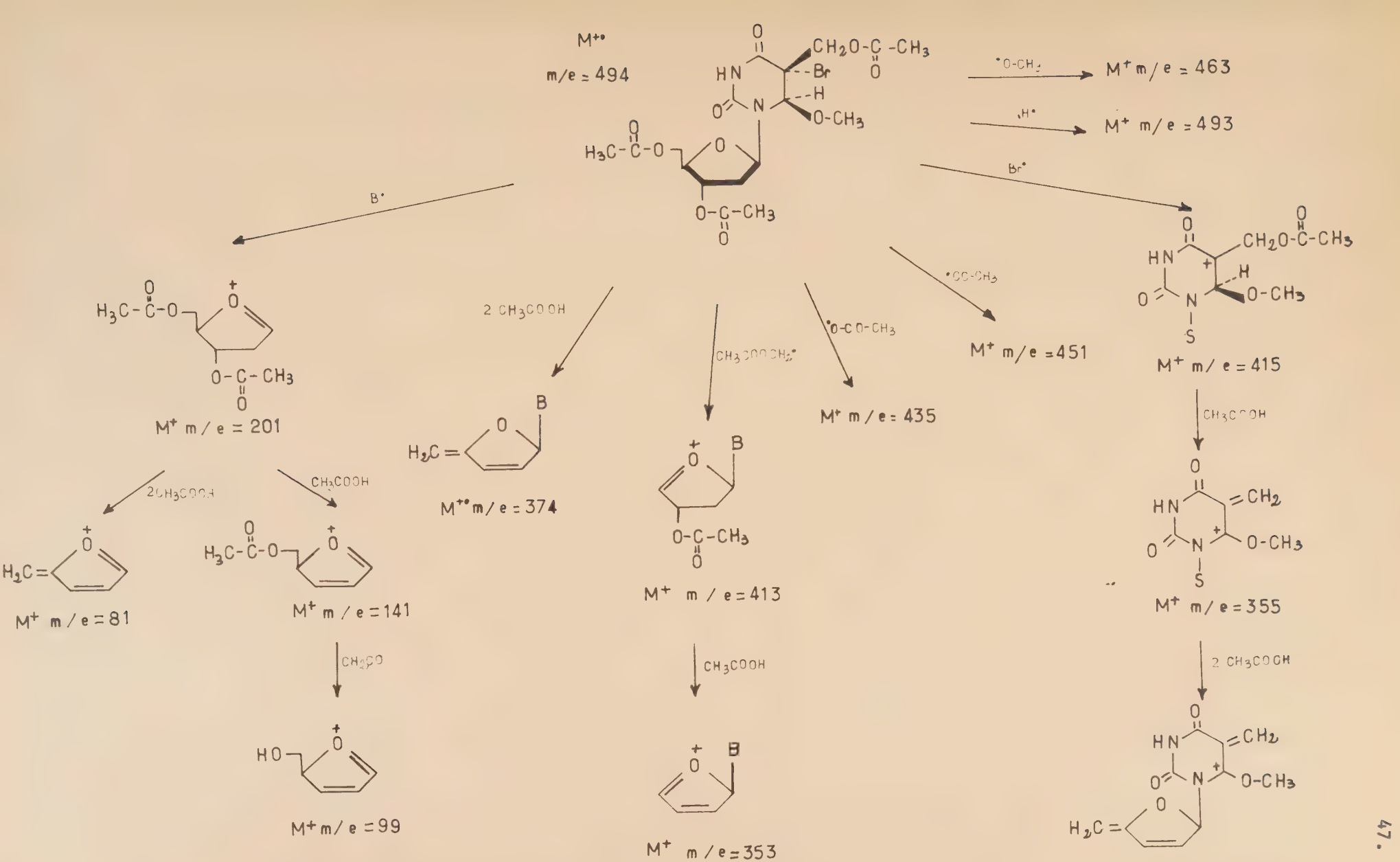


Fig. 15 : Schéma de dégradation du bromo-5 hydroxyméthyl-acétylé-5 méthoxy-6 dihydro-5,6 diacétyl-3',5' désoxy-uridine

CHAPITRE III

PARTIE EXPERIMENTALE

METHODES GENERALES.

Séparation des composés.

La séparation des diastéréoisomères des produits obtenus par synthèse a été résolue par un système chromatographique de séparation des composés de thymidine qui avait été mis au point précédemment, dans le cadre d'une étude des produits d'oxydation de la thymidine par le permanganate de potassium (16).

Les techniques chromatographiques sur couche mince de silice ont été utilisées.

Techniques analytiques : La migration des solutés se produit toujours perpendiculairement au sens de l'étalement. La chromatographie est toujours de type ascendant : les seules forces de capillarité assurent un développement rapide (1h à 2h) pour une migration du solvant de 15 à 18 cm.

Le seuil de détection UV des produits insaturés est bas (1 µg) les pyrimidines saturées se révèlent difficilement sauf si leur charge est importante.

Choix des adsorbants : Les couches de silice (0,5 mm d'épaisseur) sur plaques de verre sont obtenues en suivant les indications du fabricant. Elles sont ensuite activées à 105-110°C pendant une heure. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la silice haute pureté Macherey Nagel N/HR/UV.

Choix des solvants : deux types de systèmes de solvants ont été mis au point : un système pour les nucléosides
un système pour les nucléosides acétylés.

Les meilleures séparations, pour le premier type de composés, ont été obtenus à l'aide de mélanges eau-alcool.

Solvant 1 : chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) phase inférieure additionnée de 5 % de méthanol.

Solvant 2 :

a) acétate d'éthyle-isopropanol-eau (75:16:9)

ou b) acétate d'éthyle-méthanol-eau (75:16:20) phase supérieure additionnée de 2 % de méthanol.

En ce qui concerne les produits acétylés, le système de solvants est le suivant :

Solvant 3 : chloroforme-méthanol (95:5)

Solvant 4 : acétate d'éthyle.

Identification et caractérisation des composés.

. Les spectres ultraviolet ont été enregistrés sur un appareil CARY, modèle 15.

. Les spectres IR ont été obtenus par microspectrométrie à partir de micropastilles de bromure de potassium de 1,5 mm sur un appareil PERKIN ELMER, modèle 257.

Les composés, repérés par révélation UV, sont séparés sur bande par chromatographie sur silice. Ils sont élués par de l'eau ou du méthanol de qualité spectroscopique. L'éluat est centrifugé, filtré sur filtre millipore Solvinert, à l'aide d'une seringue puis concentré sous vide. Une fois sec, une quantité de 10 à 20 µg de composé est broyée finement avec du KBr puis les pastilles sont obtenues à l'aide du micromoule Perkin Elmer.

Pour que les spectres IR soient satisfaisants, des précautions strictes doivent être prises :

- utiliser une silice très pure,
- prendre des solvants d'élution parfaitement débarassés de toute trace d'impureté et utilisés en quantité minimale,
- éviter la présence de sels ou de substances en suspension.

. Les spectres de RMN sont enregistrés à l'aide des appareils VARIAN A 60 et VARIAN HA 100. Le tetraméthylsylane est utilisé comme référence interne dans le méthanol deutéré CD_3OD.

La quantité de produit nécessaire à l'obtention de spectres satisfaisants est de l'ordre de 50 mg. Avant l'établissement de spectre, on doit prendre soin d'échanger les H mobiles par du deutérium et de bien sécher le produit pour éviter aux pics correspondants à l'eau et au méthanol d'être trop importants.

. Le spectrographe de masse MS 9 AEI muni d'un dispositif d'introduction directe permet l'enregistrement des spectres d'impact électronique. La température de la source (Ts) est précisée pour chaque spectre et varie de 130° à 200°. L'énergie électronique est de 70 eV en général. La vaporisation de l'échantillon est contrôlée de façon à rester constante pendant le tracé du spectre. Les masses des pics ont été mesurées par enregistrement du spectre sur bande magnétique et traitées au calculateur IBM 360.40 (51). Les spectres doivent être effectués sur des produits très purs, cette pureté est vérifiée par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince à l'aide des solvants 3 et 4.

. Les analyses centésimales nous ont été fournies par le Service Central de Microanalyse du CNRS à THIAIS, à partir des produits cristallisés.

. Les points de fusion ont été mesurés au moyen d'un bloc chauffant équipé d'un microscope LEITZ.

. Les mesures de pouvoir rotatoire ont été effectuées à l'aide d'un QUICK Polarimètre (ROUSSEL & JOUAN).

BROMO-5 ALKOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMINE DESOXYRIBOSIDE.

1°) - Synthèse du bromo-5 methoxy-6 dihydro-5,6 thymine désoxyribosides.

Préparation de l'hyprobromite de méthyle.

Il a été préparé selon la méthode de DUSCHINSKY et coll. (26)

Dans un ballon contenant 18,5 ml de méthanol on ajoute 260 µl de brome (2,60 mM). On porte le mélange à -15°C à l'aide d'une saumure, puis on ajoute 4 g de carbonate d'argent. On laisse réagir une heure sous forte agitation puis on filtre la solution jaune clair dans un récipient glacé.

Addition sur la thymidine.

On refroidit une suspension de 500 mg de thymidine (2,06 mM) dans 8,5 ml de méthanol à 0°C. On ajoute alors sous agitation l'hypobromite précédemment formé. On laisse réagir 15 mn à 0°C (on remarque que toute la thymidine s'est dissoute). A la solution jaune pâle obtenue, on ajoute à température ambiante et sous forte agitation, du carbonate d'argent lentement et jusqu'à décoloration. On centrifuge alors 10 mn à 7000 tours/mn. On récupère le surnageant qu'on évapore.

On reprend le résidu par de l'acétate d'éthyle chaud et on laisse cristalliser. La cristallisation ne se produit que partiellement. Les cristaux obtenus sont séchés par de l'éther éthylique.

Séparation des produits.

La cristallisation dans l'acétate d'éthyle donne le mélange de diastéréoisomères trans. Ce mélange est constitué pour 1/3 du diastéréoisomère levogyre et pour 2/3 de diastéréoisomère dextrogyre.

A partir de 500 mg de thymidine on obtient 135 mg de cristaux (rdt = 18,5%).

La séparation des deux diastéréoisomères peut être effectuée par chromatographie sur couche mince de silice N/HR/UV. La chromatographie bidimensionnelle dans le système de solvants 1 & 2a montre que la thymidine a réagi à 90 %. On peut séparer les deux diastéréoisomères par chromatographie préparative linéaire. A partir de 500 mg de thymidine on obtient :

100 mg de diastéréoisomère levogyre

220 mg de diactéréoisomère dextrogyre

Rendement : 44 %.

Caractérisation des produits.

Spectre IR : ν_{CO} =1720 cm^{-1}

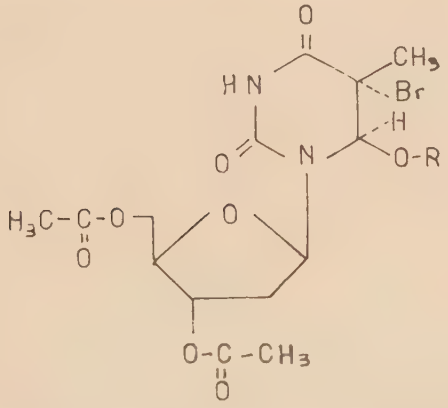
Spectre RMN (VARIAN A 60)

diast. 1 δ_{CH_3} = 1,92 $\delta_{H-5'}$ = 3,80 $\delta_{CH_3(OCH_3)}$ = 3,57
δ_{H-6} = 5,07 $\delta_{H-1'}$ = 5,70

diast. d δ_{CH_3} = 1,97 $\delta_{H-5'}$ = 3,75 $\delta_{CH_3(OCH_3)}$ = 3,52
δ_{H-6} = 5,15 $\delta_{H-1'}$ = 6,08

Spectre de masse (composé diacétylé).

Les spectres de masse de tous les composés seront enregistrés sur des produits diacétylés sur le désoxyribose en 3' et 5' du type :



Cette acétylation permet une meilleure volatilité des molécules. Pour tous les nucléosides, elle s'effectue de la même manière. Dans un petit ballon, on met en présence 0,5 mM de nucléoside, 0,2 ml d'anhydride acétique, et 3,5 ml de pyridine anhydre. Les réactifs sont laissés en contact 18 heures. On évapore alors la solution. Le nucléoside acétylé est extrait par un mélange de 5 ml de chloroforme et 5 ml d'eau. On lave la phase aqueuse par du chloroforme. Les deux phases chloroformiques sont réunies et évaporées sous vide. Le résidu est repris par du méthanol et évaporé afin d'éliminer toute trace de chloroforme. Le produit peut être cristallisé dans le méthanol.

Le spectre obtenu caractérise un produit de masse 436, qui correspond à la molécule attendue.

Analyse centésimale :

Calculé pour $C_{11}H_{17}N_2O_6Br$: C 37,41 ; H 4,85 ; N 7,93 ; O 27,18 ; Br 22,62

Trouvé : C 37,66 ; H 4,93 ; N 8,03 ; O 27,44 ; Br 22,59

Pouvoir rotatoire :

$(\alpha)_D^{20}$ diast. l - 57°36

diast. d + 63°24

Point de fusion : p.f. = 107°C.

2°) *Synthèse du bromo-5 ethoxy-6 dihydro-5,6 thymine desoxyriboside.*

Préparation de l'hypobromite d'éthyle.

Une solution de 260 µl de brome (2,6 mM) dans 18,5 ml d'éthanol anhydre, est agitée à -5° en présence de 4 g de carbonate d'argent pendant 30 mn. La solution jaune clair obtenue est filtrée dans un récipient glacé.

Addition sur la thymidine.

La solution d'hypobromite d'éthyle est ajoutée à une suspension glacée de 500 mg de thymidine (2,06 mM) dans 8 ml d'alcool éthylique anhydre.

L'agitation continue produit une solubilisation totale en 1 heure.

La solution est laissée 3 heures au froid puis on ajoute graduellement du carbonate d'argent jusqu'à décoloration.

On centrifuge alors à 7000 tours/mn pendant 10 mn. Le surnageant est récupéré et, évaporé sous vide. On reprend le résidu par de l'acétate d'éthyle chaud et on laisse le produit cristalliser. Les cristaux obtenus sont lavés puis séchés à l'éther éthylique.

Séparation des produits.

La cristallisation donne le mélange de diastéréoisomères 1 et d.

1 25 % d 75 %.

A partir de 500 mg de thymidine on obtient 215 mg de cristaux. Rdt = 28,4 %.

La migration chromatographique du mélange dans le solvant 1 permet la séparation des diastéréoisomères

1 = 50 mg d = 200 mg Rd = 33 %.

Caractérisation des produits.

Spectre IR déplacement de la bande $\nu_{C=O}$ de 1695 à 1720 cm^{-1}

Spectre de RMN (VARIAN A 60)

diast. 1 δ_{CH_3} = 1,92 $\delta_{H-5'}$ = 3,75 $\delta_{CH_3(OCH_2)}$ = 3,88
δ_{H-6} = 5,07 $\delta_{H-1'}$ = 5,60 $\delta_{CH_3(OC_2H_5)}$ = 1,13

diast. d δ_{CH_3} = 1,92 $\delta_{H-5'}$ = 3,75 δ_{CH_2} = 3,81
δ_{H-6} = 5,23 $\delta_{H-1'}$ = 6,05 δ_{CH_3} = 1,18

Spectre de masse (du dérivé acétylé)

Pic moléculaire correspondant à un produit de masse moléculaire m/e = 450.

Analyse centésimale

Calculé pour $C_{12}H_{19}N_2O_6Br$: C 39,25 ; H 5,22 ; N 7,63 ; O 26,14 ; Br 21,76

Trouvé : C 39,48 ; H 5,32 ; N 7,72 ; O 26,27 ; Br 21,70

Pouvoir rotatoire.

$(\alpha)_D^{20}$ diast 1 - 48°27

diast.d + 70°20

Point de fusion p.f. = 116°.

3°) Synthèse de l'Ethoxy-6 Dihydro-5,6 Thymine desoxyriboside.

Ce composé est formé par réduction des Bromo-5 Ethoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine. Méthode de Nofre et Ogier (54).

On synthétise les Bromo-5 Ethoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine à partir de 500 mg de thymidine.

Le produit brut de la réaction (avant séparation chromatographique) est repris par 30 ml d'eau distillée et refroidi à 0°C. Sous agitation, à 0°C, on ajoute 2g de zinc en poudre, on attend que l'équilibre thermique soit à nouveau atteint puis on ajoute 600 µl d'acide acétique.

La réaction se poursuit pendant 20 mn à 0°C. Le zinc est alors filtré, le filtrat gelé dans l'azote liquide puis lyophilisé.

Le produit sec est déposé sur plaques NHR/UV, mis à migrer dans le solvant 1. Les bandes sont repérées à l'UV, récupérées et éluées.

On obtient ainsi deux diastéreoisomères d'Ethoxy-6 Dihydro-5,6 Thymidine.

Caractérisation du diastéreoisomère dextrogyre par R.M.N.

$\delta H_{1'} = 5,97$	$\delta H_6 = 5,07$	$\delta CH_2 = 1,18$
$\delta H_{3'} = 4,33$	$\delta H_5 = 2,82$	δCH_3 (O-CH_3) = 3,57
	$\delta CH_3 = 1,32$	

4°) Synthèse du bromo-5 butoxy-6 dihydro 5,6 thymine desoxyriboside.

Préparation de l'hypobromite de butyle.

Une solution de 260 µl de brome (2,6 mM) dans 20 ml de butanol est agitée 25 mn avec 4 grammes de carbonate d'argent à température ambiante. La suspension est filtrée dans un récipient.

Addition sur la thymidine.

La solution d'hypobromite est versée dans une suspension de 500 mg de thymidine dans 10 ml de butanol. On laisse réagir 2 heures à température ambiante puis on ajoute 100 µl de brome. 10 mn après, toute la thymidine est dissoute. On laisse la réaction se poursuivre 18 h.

Du carbonate d'argent est alors ajouté par petites quantités jusqu'à décoloration. La suspension est centrifugée 10 mn à 7000 tours/mn puis le surnageant évaporé sous vide.

Séparation des produits.

Après évaporation on obtient un résidu de 800 mg. Il est repris par du méthanol et déposé linéairement sur des plaques de silice N-HR/UV. Elles sont mises à migrer dans le solvant 1. On obtient ainsi respectivement :

60 mg de diastéréoisomère levogyre
240 mg de diastéréoisomère dextrogyre

Rendement = 29,6 %.

Ces produits n'ont pu être jusqu'à présent cristallisés.

Caractérisation des produits.

Spectre IR déplacement de la bande $\nu_{C=O}$ à 1720 cm^{-1}

Spectre RMN (VARIAN A 60)

diast. 1 δ_{CH_3} = 1,93 $\delta_{H-5'}$ = 3,78 δ_{OCH_2} = 3,82
δ_{H-6} = 5,08 $\delta_{H-1'}$ = 5,67 δ_{CH_2} = 1,44
δ_{CH_3} = 0,90

diast. d δ_{CH_3} = 1,91 $\delta_{H-5'}$ = 3,74 δ_{OCH_2} = 3,80
δ_{H-6} = 5,19 $\delta_{H-1'}$ = 6,02 δ_{CH_2} = 1,45
δ_{CH_3} = 0,88

Spectre de masse (composé acétylé)

Spectre de masse d'un produit m/e = 478 dont le schéma de dégradation correspond à celui du composé attendu.

Pouvoir rotatoire.

$(\alpha)_D^{20}$ diast. 1 - 14°12
diast. d + 55°36.

5°) *Synthèse du bromo-5 Isoamyloxy 6 dihydro 5,6 thymine désoxyribosïde*

Préparation de l'hypobromite d'isoamyle.

L'hypobromite de l'alcool isoamylique est préparé à température ambiante en une heure par action de 260 µl de brome (2,6 mM) sur 20 ml d'alcool isoamylique en présence de 5 g de carbonate d'argent sous forte agitation. La suspension est alors filtrée et le filtrat conservé dans un récipient jusqu'à son utilisation.

Addition sur la thymidine.

A une suspension de thymidine (500 mg, 2,06 mM) dans 10 ml d'alcool isoamylique est ajoutée l'hypobromite précédemment formé. Au bout d'une heure on ajoute 100 µl de brome puis on laisse réagir 24 h à température ambiante et sous forte agitation.

La solution est alors neutralisée par addition progressive de carbonate d'argent sous agitation jusqu'à décoloration. La suspension est centrifugée 10 mn à 7000 tours/mn et le surnageant évaporé.

Séparation des produits.

Ces composés n'ont pu être jusqu'à présent obtenus sous forme cristalline. Ils ont cependant pu être séparés par chromatographie préparative sur gel de silice N-HR/UV et migration dans le solvant 1.

A partir de 500 mg de thymidine, on a obtenu après extraction du produit de la silice

- 180 mg de diastéréoisomère dextrogyre
  50 mg de diastéréoisomère levogyre.

Rendement = 27,3 %.

Caractérisation des produits.

Spectre IR déplacement de la bande d'absorption $\nu_{C=O}$ de 1695 à 1720 cm^{-1}

Spectre RMN (VARIAN A 60)

diast. 1 $\delta_{CH_3} = 1,91$ $\delta_{H-5'} = 3,75$ $\delta_{OCH_2} = 3,86$
$\delta_{H-6} = 5,02$ $\delta_{H-1'} = 5,60$ $\delta_{CH_2} = 1,48$
$\delta_{CH} = 3,58$
$\delta_{2CH_3} = 0,88$

diast. d $\delta_{CH_3} = 1,92$ $\delta_{H-5'} = 3,74$ $\delta_{OCH_2} = 3,86$
$\delta_{H-6} = 6,03$ $\delta_{H-1'} = 5,20$ $\delta_{CH_2} = 1,45$
$\delta_{CH} = 3,59$
$\delta_{2CH_3} = 0,89$

Spectre de masse (dérivé acétylé)

Le spectre est en accord avec le composé prévu et sa structure. Le pic moléculaire est visible, bien que faible, à m/e = 492.

Pouvoir rotatoire.

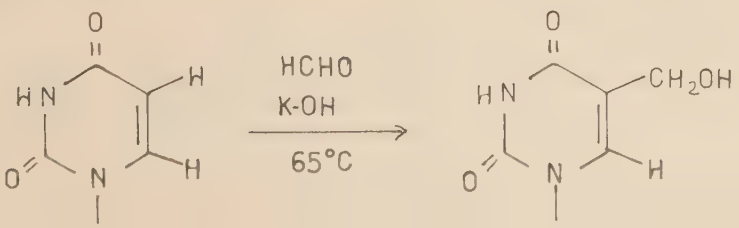
$(\alpha)_D^{20}$ diast. 1 - 27°47
diast. d + 61°43

6°) *Synthèse du bromo-5 hydroxyméthyl-5 methoxy-6, dihydro-5,6 uracile desoxyriboside.*

a) *Préparation du 5-hydroxymethyl-desoxy-uridine.*

Ce produit de base est préparé par la méthode mise au point par BAKER (3).

Cette synthèse s'effectue selon le mécanisme de CANNIZZARO, par action du formaldehyde sur la double liaison de la désoxyuridine en milieu très basique selon l'équation :



456 mg de désoxyuridine (2 mM) sont mis à réagir dans un ballon avec 2 ml d'une solution aqueuse de formaldéhyde à 35 % (v/v) en présence de 2 ml d'une solution de potasse normale. Le ballon est placé dans une étuve réglée à 65°C.

En raison de l'acidification du milieu, toutes les 24 heures et pendant 4 jours, on ajoute 2 ml d'une solution de potasse normale, et le ballon est conservé à l'étuve.

La solution est encore chauffée à 65°C deux jours supplémentaires. Après six jours, à la solution refroidie on ajoute 12 ml de résine DOWEX 50 H^+ lavée préalablement trois fois à l'eau distillée, et 28 ml d'eau distillée. Cette suspension est mise en agitation pendant 1 h, puis la solution est filtrée sur une colonne, que l'on lave ensuite par 40 ml d'eau distillée.

Les deux filtrats rassemblés sont concentrés sous vide. Le résidu sec, repris par un peu d'eau est déposé linéairement sur 30 plaques N-HR/UV et mis à migrer dans le solvant 2a car les produits sont mieux séparés (dans le solvant 1, ils ont tendance à migrer en trainées).

L'hydroxyméthyl-5 désoxyuridine est alors extrait à l'eau. Quantité obtenue : 300 mg. Rendement : 58 %.

Désoxyuridine	$Rf_1 = 0,38$	$Rf_{2a} = 0,57$
Hydroxyméthyl-5 désoxyuridine	$Rf_1 = 0,23$	$Rf_{2a} = 0,46$

Caractérisation desproduits.

Spectre IR

ν_{max}^{KBr} 1700 cm^{-1} (C=O), 1050, 1083 (C-OH)

Spectre RMN (VARIAN A 60-D_2O)

δ H_2', H_2''	2,35 ppm
δ H_5'	3,75
δ H_3'	3,97
δ CH_2 (exocyclique pyrimidique)	4,34
δ H_1'	6,24.

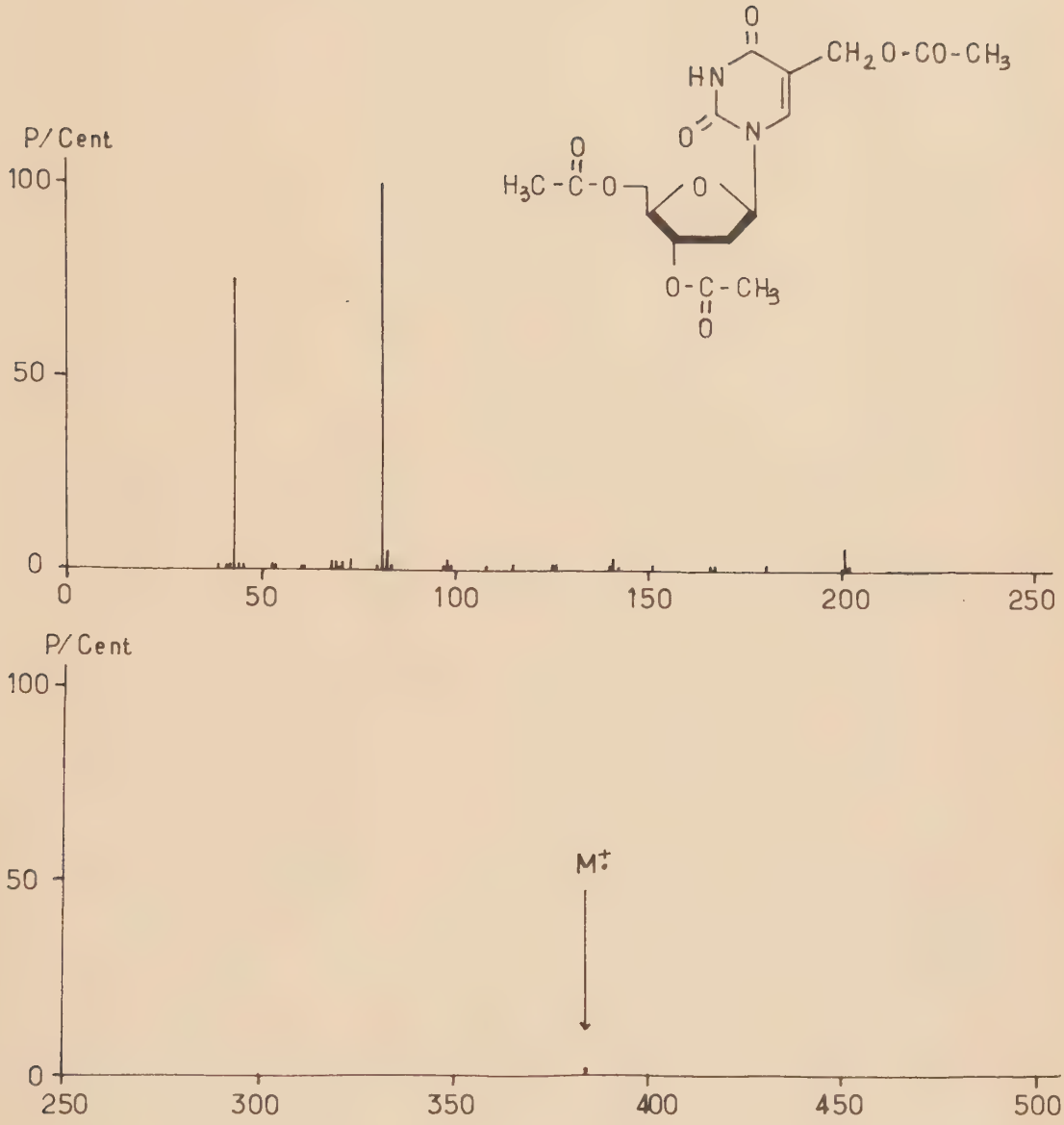


Fig. 1 : Spectre de masse diacétyl-3',5' hydroxyméthyl-acétylé-5 désoxy-uridine

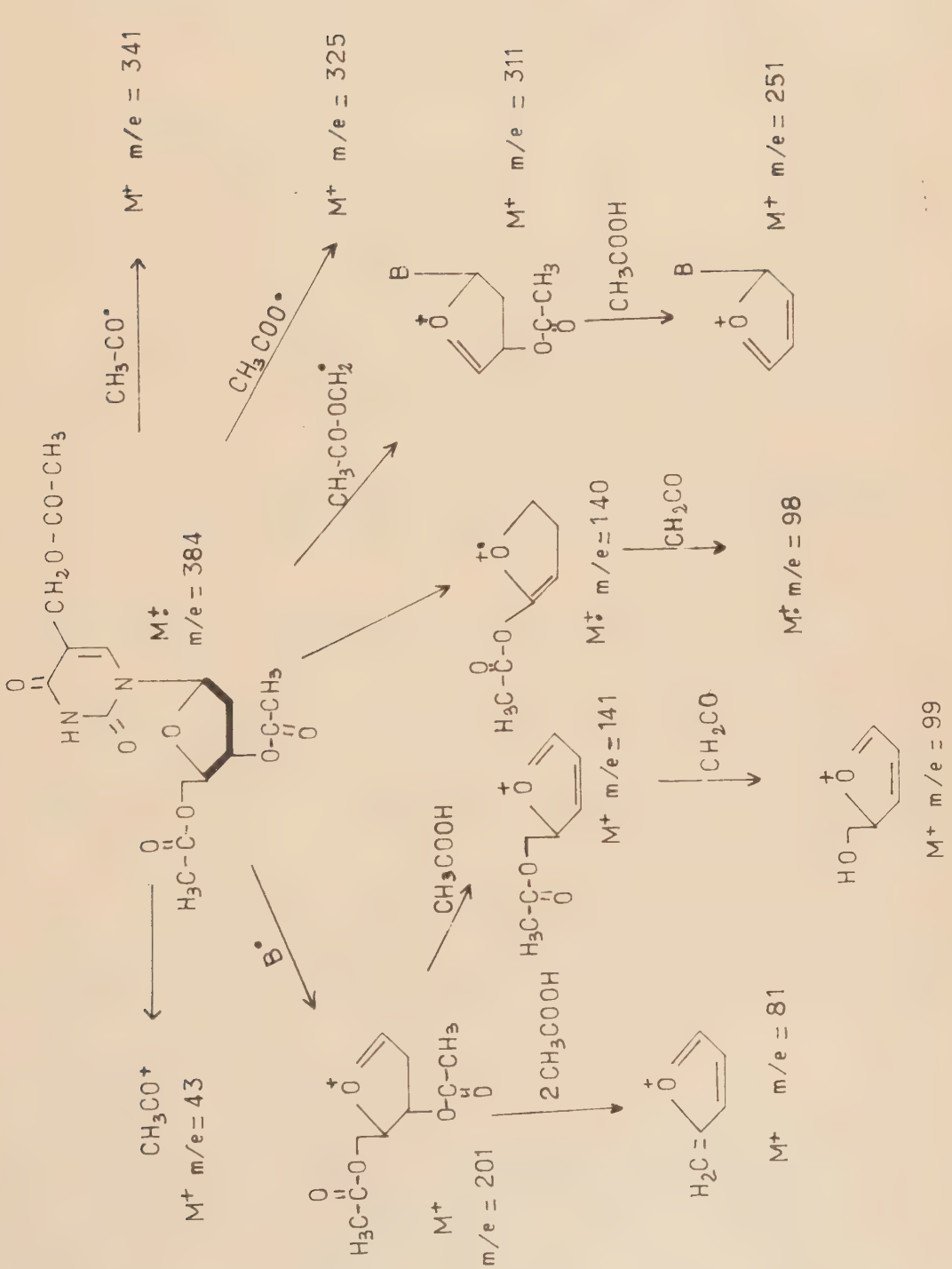


Fig.2 : Schéma de dégradation du diacétyl-3',5' hydroxyméthyl-acétylé-5 désoxy-uridine

Spectre de masse = (produit acétylé) : un pic moléculaire notable est observé à m/e = 384 correspondant à la masse moléculaire de la molécule triacétylée.

Point de fusion p.f. 167°C

b) Addition sur la double liaison 5,6 de Me-O-Br.

Préparation de l'hypobromite de méthyle.

Dans un ballon, contenant 18,5 ml d'alcool méthylique, on ajoute 260 µl de brome (2,6 mM). Le mélange est porté à -15°C à l'aide d'une saumure puis on ajoute 4 g de carbonate d'argent.

La réaction se poursuit une heure sous forte agitation puis la solution jaune clair est filtrée dans un récipient glacé.

Addition sur l'hydroxyméthyl-5 désoxyuridine.

Une suspension de 400 mg de hydroxyméthyl-5 désoxyuridine (1,55 mM) dans 10 ml de méthanol est refroidie à 0°C. On ajoute alors sous agitation l'hypobromite formé. L'addition se poursuit pendant 3 heures à 0°C puis une fois la température remontée jusqu'à 20°C, la réaction se continue pendant 2 jours.

A la solution on ajoute progressivement par petites quantités du carbonate d'argent jusqu'à décoloration. Le mélange est centrifugé 10 mn à 7000 tours/mn puis le surnageant est concentré sous vide.

Séparation des produits.

Les produits sont séparés par chromatographie préparative sur plaque de silice et migration dans le solvant 1.

diast. l 27 mg

diast. d 49 mg

Rdt = 13 %.

Caractérisation du diastéréoisomère d.

Spectre IR déplacement de la bande d'absorption $\nu_{C=O}$ de 1700 cm^{-1} à 1710 cm^{-1}.

Spectre RMN.

$\delta_{H-6} = 5,18$ $\delta_{H-5'} = 3,76$ $\delta_{OCH_3} = 3,58$

$\delta_{CH_2OH} = 4,10$ $\delta_{H-1'} = 6,14$

Spectre de masse (dérivé triacétylé) Pic moléculaire très faible mais cependant détecté à m/e = 495.

BROMO-5 ALCOYLOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMINE DESOXYRIBOSIDE.

1) Synthèse des composés.

Cette synthèse s'effectue en une seule étape, dans des conditions de pH proches de la neutralité.

Dans un ballon, sous forte agitation et à température ambiante, la thymidine (242 mg, 1 mM), et le sel (benzoate ou acétate de Na) (5 mM) sont agités dans un mélange de dioxanne-eau (10 ml : 2 ml). Lorsque la solubilisation est totale, on ajoute 2 mM de brome (200 µl), on laisse réagir 15 mn puis on évapore à sec sous vide.

Le résidu est repris par de l'acétone : les produits organiques s'y dissolvent, le bromure de sodium insoluble précipite. Le bromure de sodium est filtré puis la phase organique est évaporée.

2) Séparation des produits.

Ces produits n'ont pu être obtenus par cristallisation jusqu'à présent.

Les diastéréoisomères sont séparés par chromatographie sur couche mince de silice dans le système de solvants 1.

a) *Bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymine désoxyriboside* : à partir de 242 mg de thymidine, on obtient 72 mg de diastéréoisomère dextrogyre et 58 mg de diastéréoisomère levogyre.

b) *Bromo-5 acetoxy-6 dihydro-5,6 thymine désoxyriboside* : à partir de 242 mg de thymidine on obtient 54 mg de diastéréoisomère dextrogyre et 33 mg de diastéréoisomère lévogyre.

3°) Caractérisation des produits.

BROMO-5 BENZOYLOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMIDINE.

Spectre IR déplacement de la bande $\nu_{C=O}$ de 1695 à 1720 cm^{-1}
Bandes d'absorption des substituants aromatiques notables à ν1600 et ν712 cm^{-1}

Spectre RMN

Diast. l	δ_{CH_3} = 1,88	$\delta_{H-1'}$ = 6,14	$\delta_{2H\ Benz}$ = 7,91
	δ_{H-6} = 6,87	$\delta_{H-5'}$ = 3,78	$\delta_{3H\ Benz}$ = 7,58
Diast. d	δ_{CH_3} = 1,88	$\delta_{H-1'}$ = 6,23	$\delta_{2H\ Benz}$ = 7,87
	δ_{H-6} = 6,78	$\delta_{H-5'}$ = 3,58	$\delta_{3H\ Benz}$ = 7,55

Spectre de masse (sur produit diacétylé).

Le spectre correspond à la molécule de masse m = 526 et le schéma de dégradation correspond à la molécule indiquée.

Analyse centésimale.

Calculé pour $C_{17}H_{19}N_2O_7Br$: C 46,06 ; H 4,32 ; N 6,32 ; O 25,26 ; Br 18,03

Trouvé : C 45,38 ; H 4,47 ; N 6,25 ; O 25,25 ; Br 17,50

Point de fusion. p.f. = 147°

Pouvoir rotatoire.

$(\alpha)_D^{20}$ diast. 1 $-62°40$

diast. d $+104°08$

BROMO-5 ACETOXY-6 DIHYDRO-5,6 THYMIDINE

Spectre IR déplacement de $\nu_{C=O}$ de 1695 à 1720 cm^{-1}

Spectre RMN (VARIAN A 60)

diast 1	$\delta_{CH_3} = 1,93$	$\delta_{H1'} = 6,01$	$\delta_{CH_3} = 2,13$ $(CO-CH_3)$
	$\delta_{H6} = 6,54$	$\delta_{H5'} = 3,76$	
diast d	$\delta_{CH_3} = 1,95$	$\delta_{H1'} = 6,24$	$\delta_{CH_3} = 2,12$ $(CO-CH_3)$
	$\delta_{H6} = 6,51$	$\delta_{H5'} = 3,64$	

TABLEAU DES Rf DES COMPOSES SYNTHETISES

	Rf_1	Rf_2
Trans Bromo-5 methoxy-6 dihydro-5,6 thymidine l	0,61	0,70
Trans Bromo-5 methoxy-6 dihydro-5,6 thymidine d	0,55	0,70
Trans Bromo-5 ethoxy-6 dihydro-5,6 thymidine l	0,75	0,88
Trans Bromo-5 ethoxy-6 dihydro-5,6 thymidine d	0,69	0,88
Trans Bromo-5 butoxy-6 dihydro-5,6 thymidine l	0,72	0,84
Trans Bromo-5 butoxy-6 dihydro-5,6 thymidine d	0,64	0,84
Trans Bromo-5 isoamyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine l	0,75	0,86
Trans Bromo-5 isoamyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine d	0,68	0,86
Trans Bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine l	0,68	0,87
Trans Bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine d	0,72	0,87
Trans Bromo-5 acetoxy-6 dihydro-5,6 thymidine l	0,54	0,83
Trans Bromo-5 acetoxy-6 dihydro-5,6 thymidine d	0,62	0,85
Hydroxyméthyl- 5 désoxyuridine	0,23	0,48
Trans Bromo-5 méthoxy-6 hydroxyméthyl-5 dihydro-5,6 désoxyuridine l	0,52	
Trans Bromo-5 méthoxy-6 hydroxyméthyl-5 dihydro-5,6 désoxyuridine d	0,46	
Cis Ethoxy-6 dihydro-5,6 thymidine l	0,60	
Cis Ethoxy-6 dihydro-5,6 thymidine d	0,55	

Rf_1 : dans Chloroforme-méthanol-eau (4:2:1) + 5 % MeOH

Rf_2 : dans Acétate d'éthyle-isopropanol- eau (75:16:9)

IIème PARTIE

ETUDE BIOLOGIQUE DES NUCLEOSIDES MODIFIES

METHODES D'ETUDE DES INHIBITEURS.

Plusieurs méthodes d'étude ont été utilisées pour étudier le rôle de ces effecteurs. Les plus importantes sont l'utilisation de précurseurs contenant des isotopes radioactifs, l'emploi de mutants bactériens auxotrophes incapables de synthétiser tel ou tel métabolite essentiel, et enfin l'examen des réactions enzymatiques individuelles à partir de préparations enzymatiques globales ou d'enzymes purifiés.

1/ Utilisation des précurseurs radioactifs.

Soit une chaîne métabolique du type :

$$\rightarrow A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow [\,F\,]$$
$$\uparrow$$
$$G$$

Si on incorpore A^* dans une première expérience, G^* dans une seconde, en présence de l'inhibiteur à étudier et que l'on mesure la radioactivité du produit de fin de chaîne F, plusieurs cas peuvent se présenter :

Exemples :

Soit F_1 la radioactivité du Produit F lorsque l'on incorpore A^* en présence de l'inhibiteur, F_2 sa radioactivité mesurée si on incorpore G^* en présence de l'inhibiteur, F_{1t} et F_{2t} les radioactivités témoins.

Si on a,

$F_1 = F_{t1}$ $\quad F_2 = F_{t2}$ $\Rightarrow$ produit inactif dans la chaîne

$F_1 < F_{t1}$ $\quad F_2 = F_{t2}$ $\Rightarrow$ produit actif entre A et C.

Cette méthode d'étude par utilisation de précurseurs radioactifs a été et est de plus en plus utilisée. On peut citer son utilisation par RABKIN en 1962 (61) pour étudier l'action du 5-fluoroorotate in vivo.

De l'orotate, marqué par du ^{14}C sur la fonction acide carboxylique, ou son précurseur, est donné à des rats et la radioactivité du gaz carbonique expiré est mesurée. En présence de 5-fluoroorotate, la radioactivité de CO_2 expiré diminuera de 10 à 15 %. De ce résultat, il déduit que l'action du 5-fluoroorotate in vivo a lieu avant la décarboxylation de l'orotidylate.

D'autres inhibiteurs ont été étudiés par cette voie. C'est le cas de l'iododesoxyuridine. Ce composé semble être un antagoniste compétitif de la thymidine (60) mais les tentatives de DELAMORE et PRUSOFF en 1961 (23) pour déterminer plus spécifiquement la nature de cette compétition n'ont pas été concluantes. L'incubation des cellules avec de la thymidine marquée entraîne la formation de thymidylate radioactif (TMP, TDP, et TTP) ainsi que de l'ADN*.

Si IUdR est ajoutée à une incubation de cellules leucémiques L 5178 Y, on observe une diminution de la radioactivité de chacun de ces produits. Cependant, si des cellules d'Ascites d'Ehrlich sont utilisées dans de semblables expériences, il se produit une forte diminution de la radioactivité de l'ADN mais aucune variation dans la radioactivité des thymidylates intermédiaires. L'IUdR agit donc différemment selon les organismes considérés :

- dans les cellules d'Ascites d'Ehrlich il inhibe l'ADN polymérase,
- dans les cellules L 5178 Y, ce sont les différentes kinases qui sont touchées.

La méthode des précurseurs radioactifs est intéressante car elle peut aussi bien s'appliquer in vivo qu'in vitro, contrairement à l'étude enzymatique, mais elle ne peut fournir que des résultats grossiers qui devront être précisés par une étude enzymatique plus fine.

2/ Etudes enzymatiques des inhibiteurs.

Cette méthode peut être appliquée dans un premier temps à l'étude de la réaction enzymatique que l'on suppose modifiée par l'inhibiteur à partir d'un extrait enzymatique global. On pourra ensuite purifier l'enzyme et mener une étude aussi poussée que possible.

Ces études permettront de déterminer les différentes constantes de la réaction enzymatique telles que la vitesse maximum (Vm), la constante de MICKAELIS(K_m), la vitesse en présence de l'inhibiteur (Vi),la constante de dissociation du complexe EI (Ki) : on pourra ainsi préciser la différence d'affinité du substrat et de l'inhibiteur pour l'enzyme. Un autre résultat pourra être ainsi obtenu : le type d'action de l'inhibiteur (compétitif, non compétifif, mixte ou incompétitif).

Cette méthode d'étude a été utilisée par OKAZAKI et KORNBERG en 1961 sur la désoxythymidine kinase d'Escherichia Coli (56). Le substrat utilisé était la thymidine ^{14}C-2 et le test mesurait la conversion de TdR en TMP par séparation électrophorétique et comptage de la radioactivité des composés par un compteur à scintillation liquide.

BRESNICK et THOMPSON (1965) (14) ont mené une semblable étude mais plus poussée sur les inhibiteurs de la désoxythimidine kinase de tumeurs animales. Le substrat utilisé est la thymidine ^{14}C-2, les tumeurs employées : l'hépatome d'ascites de Novikoff, l'hépatome MDAB de Mc COY, le sarcome de Walker. L'activité de la thymidine kinase est mesurée par la méthode des disques de cellulose DEAE, mise au point par BOLLUM et POTTER (10) et par BREITMAN (11).

CHI-BOM CHAE et coll. en 1972 (9) ont étudié par cette méthode la TMP Kinase à partir d'un extrait brut de cellules d'ascites d'Ehrlich et de foie de rat en régénérescence. Le test consiste en une séparation du TDP et TTP formés à partir de TMP tritié, en présence ou non d'inhibiteurs, par chromatographie sur papier DEAE puis comptage des taches radioactives.

Ce sont ces deux types de méthodes (utilisation de précurseurs radioactifs, étude enzymatique) qui vont être maintenant utilisés pour étudier les analogues structuraux des nucléosides précédemment synthétisés.

CHAPITRE I

ACTION DES ANALOGUES DE THYMIDINE SUR L'INCORPORATION DE PRECURSEURS RADIOACTIFS DANS L'ADN DES CELLULES D'ASCITES D'EHRLICH

La thymidine 5'-triphosphate (dTTP) est l'un des quatre désoxyribonucléotides nécessaires à la polymérisation de l'ADN. Il existe deux voies anaboliques de bio ynthèse de la thymidine 5'-monophosphate (dTMP), précurseur du dTTP.

La première voie, que l'on considère comme étant la principale pour la synthèse du dTMP, correspond à la méthylation de la désoxyuridine 5'-monophosphate par la thymidylate synthétase. La seconde, catalysée par la thymidine kinase, correspond à la phosphorylation de la thymidine en position 5'. Cette seconde voie représente un mécanisme de sauvetage des cellules. C'est ce mécanisme qui est mis en jeu, lors de l'utilisation de thymidine comme précurseur de l'ADN. Il est en effet beaucoup moins coûteux pour un organisme de puiser les composés pyrimidiques à une source interne ou externe, que de les synthétiser à partir de petites molécules.

Quand la thymidine est ajoutée à un système biologique, le temps de phosphorylation dépend de la nature de ce système. En ce qui concerne les cellules d'Ascites d'Ehrlich, les études de GRAV et SMELLIE (31) montrent que 80 % de la thymidine sont phosphorylés en 20 minutes et que la majorité de précurseur est incorporée dans l'ADN au bout d'une heure.

A - METHODES EXPERIMENTALES.

L'essai d'incorporation des précurseurs est mis en oeuvre dans les cellules d'Ascites d'Ehrlich. Son but est de déterminer les effets des analogues structuraux de thymidine sur la biosynthèse de novo de l'ADN. Son principe est de comparer dans le temps, la radioactivité de l'ADN synthétisé, en présence ou non des dérivés nucléosidiques à différentes concentrations.

1) Préparation du milieu d'incubation.

La tumeur ascitique d'Ehrlich est cultivée sur des souris Swiss femelles.

On a pu obtenir une lignée permanente de cette tumeur par repiquages hebdomadaires : le fluide ascitique d'une souris est prélevé intrapéritonéalement puis transplanté par piqure sous cutanée de 0,5 ml chez des souris dont l'âge n'exède pas deux mois.

Le septième jour après inoculation le fluide ascitique formé est prélevé, lavé par du sérum physiologique, centrifugé 2 minutes à 5000 tours/minute. Le surnageant est éliminé et ce traitement est répété deux fois.

A partir du culot cellulaire obtenu, on prépare une dilution à 10 % à l'aide de sérum physiologique. Cette dilution ($\sim 2.10^6$ cellules/ml) constitue la solution mère, prête pour les incubations.

- incubation témoin : 2,5 ml de solution mère
  100 µl de sérum physiologique
  10 µl de précurseur radioactif.

- incubations en présence d'analogues structuraux à différentes concentrations : 2,5 ml de solution mère
  100 µl de solution aqueuse d'inhibiteur
  100 µl de précurseur radioactif.

Le précurseur radioactif est ajouté après une préincubation de 5 mn des cellules (temps to) - Pendant toute la durée de l'expérience, les cellules sont agitées dans un incubateur dont la température est fixée à 37°C.

Afin de suivre la cinétique de l'incorporation du précurseur radioactif, toutes les 10 minutes des prélèvements sont effectués.

2) Mesure de la biosynthèse de l'ADN.

La méthode décrite par Mans et Novelli (50) est utilisée. Elle consiste en une microprécipitation de l'ADN sur un support qui sera "compté" dans un mélange scintillant approprié.

Cette méthode, revue par SUSS et WOLM (74), que nous avons adaptée à nos besoins, peut se diviser en plusieurs étapes :

1) Le prélèvement à partir du milieu d'incubation est réalisé à l'aide d'une micropipette automatique (type eppendorf). Ainsi, 100 µl sont déposés sur une bande de papier Whatman 3 MM.

Cette dernière est séchée sur une plaque chauffante, 10 minutes à 80°C.

Les cellules sont tuées et adhèrent au papier.

2) La bande de papier est ensuite traitée à l'acide trichloracétique (TCA) à 10 %, à 0°C pendant au moins une heure. On obtient ainsi la précipitation des macromolécules que sont les acides nucléiques et les protéines.

3) Deux lavages successifs de 15 mn dans le TCA 5 % sont effectués à température ambiante, ce qui a pour but d'éliminer tous les nucléotides dans la phase acido-soluble.

4) Les lipides sont ensuite extraits par un mélange alcool éthylique-éther éthylique (1:1,v/v) en 30 minutes à température ambiante.

5) Deux traitements de 15 minutes à l'éther éthylique éliminent toute trace de TCA.

6) Les papiers, séchés, sont découpés et placés dans des flacons de comptage. On ajoute un mélange scintillant dont la composition est la suivante:

Dioxanne	1 litre
Poudre PPO	6 grammes
POPOP	0,3 gramme
Alcool éthylique	
Absolu	100 ml
Ethylène glycol	20 ml
Naphtalène	100 grammes.

Les comptages sont effectués à l'aide d'un Tricarb Packard. Le rendement radiochimique atteint 80 %, l'erreur relative étant toujours inférieure à 2 %.

B - RESULTATS ET DISCUSSION.

1) Incorporation de thymidine radioactive.

Le précurseur utilisé est la thymidine marquée sur le méthyle par du carbone 14 - (CMM 162. Activité spécifique : 55,3 mCi/mM, 1 µCi/ 10 µl, CEA Saclay).

Les dérivés des deux familles d'analogues provoquent tous une nette diminution de l'incorporation de la thymidine * dans l'ADN pour des concentrations de l'ordre de $10^{-4}ML^{-1}$ (fig. A, B et tabl.1 p.80). Pour des concentrations plus faibles ($10^{-5}ML^{-1}$) aucune action de ces composés n'est décelable. Pour des concentrations plus élevées ($10^{-3}ML^{-1}$), on note une très forte inhibition de l'incorporation du précurseur dès les premières minutes (fig. C, D).

Les deux formes diastéréoisomériques présentent les mêmes propriétés. Aucune différence importante n'est décelable.

A partir de ces résultats on a pu émettre deux hypothèses :

1) Ces produits bloquent la biosynthèse de l'ADN soit au niveau de la polymérisation des nucléotides (fig. E, 1), soit au niveau de la phosphorylation du dTMP (fig. E, 2, 3).

2) Ces composés inhibent la phosphorylation de la thymidine, ce qui l'empêche d'entrer dans la voie de biosynthèse de l'ADN sous forme de dTMP (fig. E, 4).

L'utilisation d'autres précurseurs en présence de ces dérivés nucléosidiques pourrait fournir des résultats supplémentaires. C'est dans ce but que nous avons essayé la désoxyguanosine et la désoxycytidine.

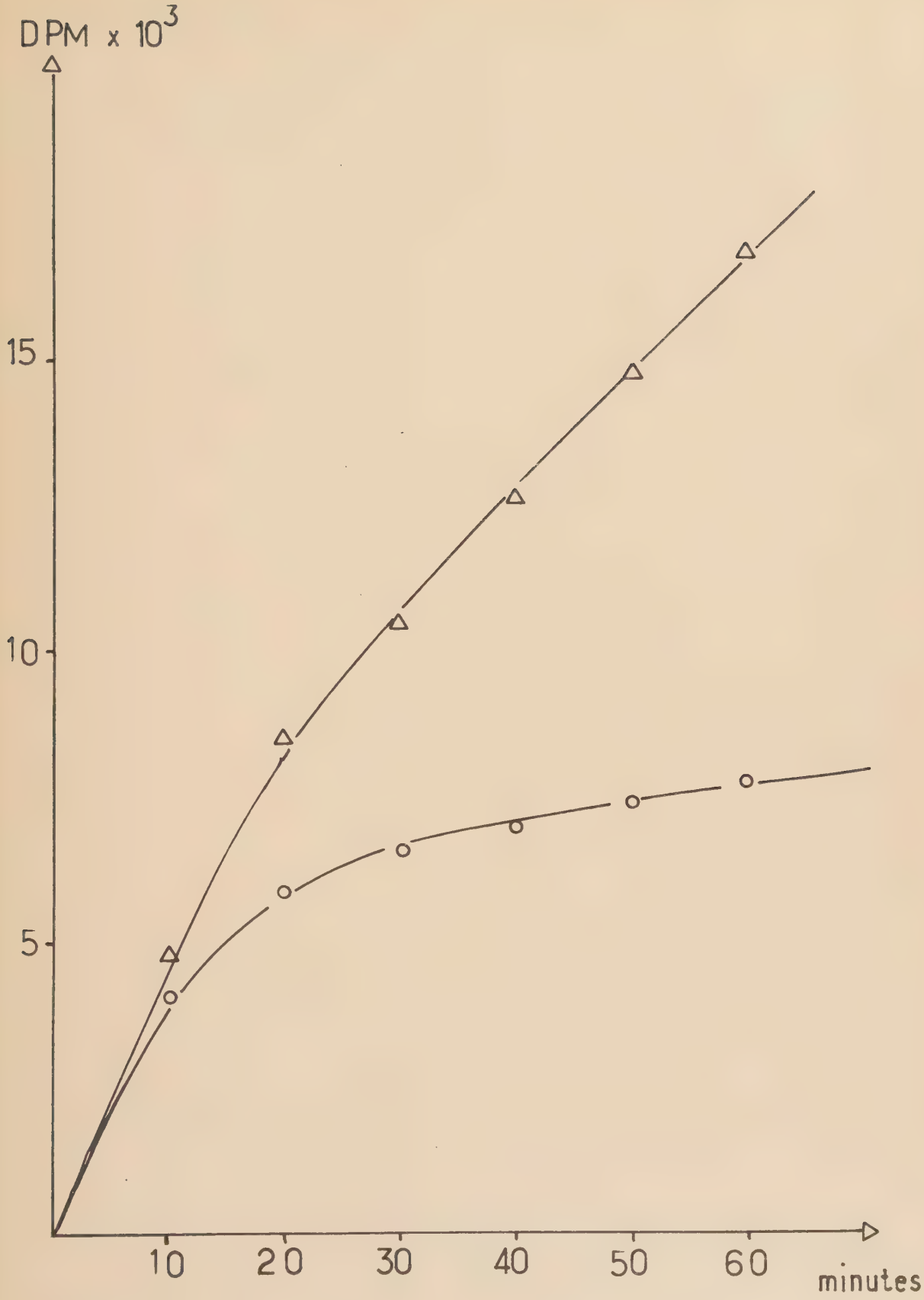


Figure **A** : Cinétique d'incorporation de [illegible] avec 10^{-4} M L^{-1} de BMT (o)

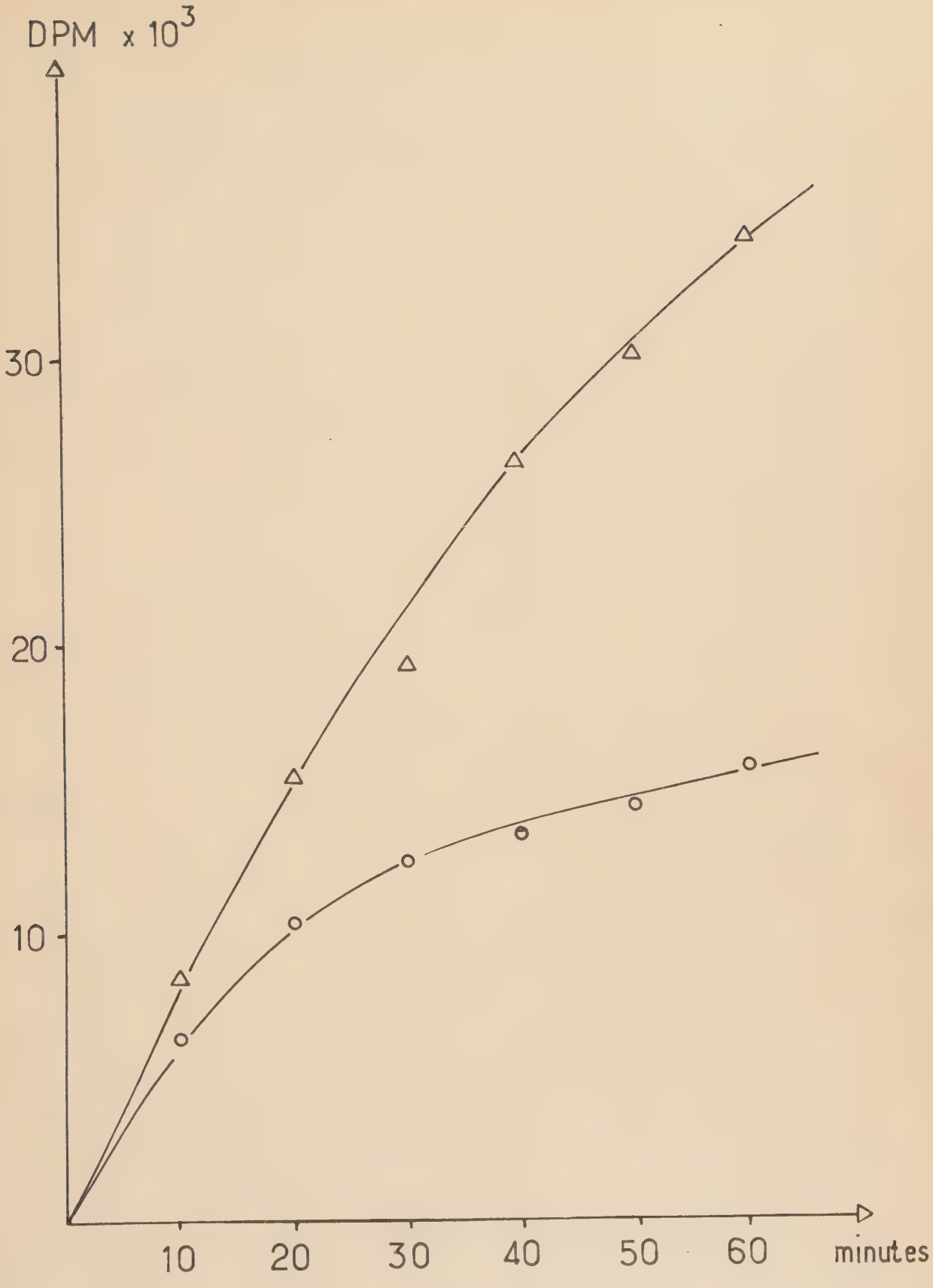


Figure **B** : Cinétique d'incorporation de la thymidine méthyle ^{14}C sans BBT
avec 2.10^{-4} M l^{-1} de BBT (•)

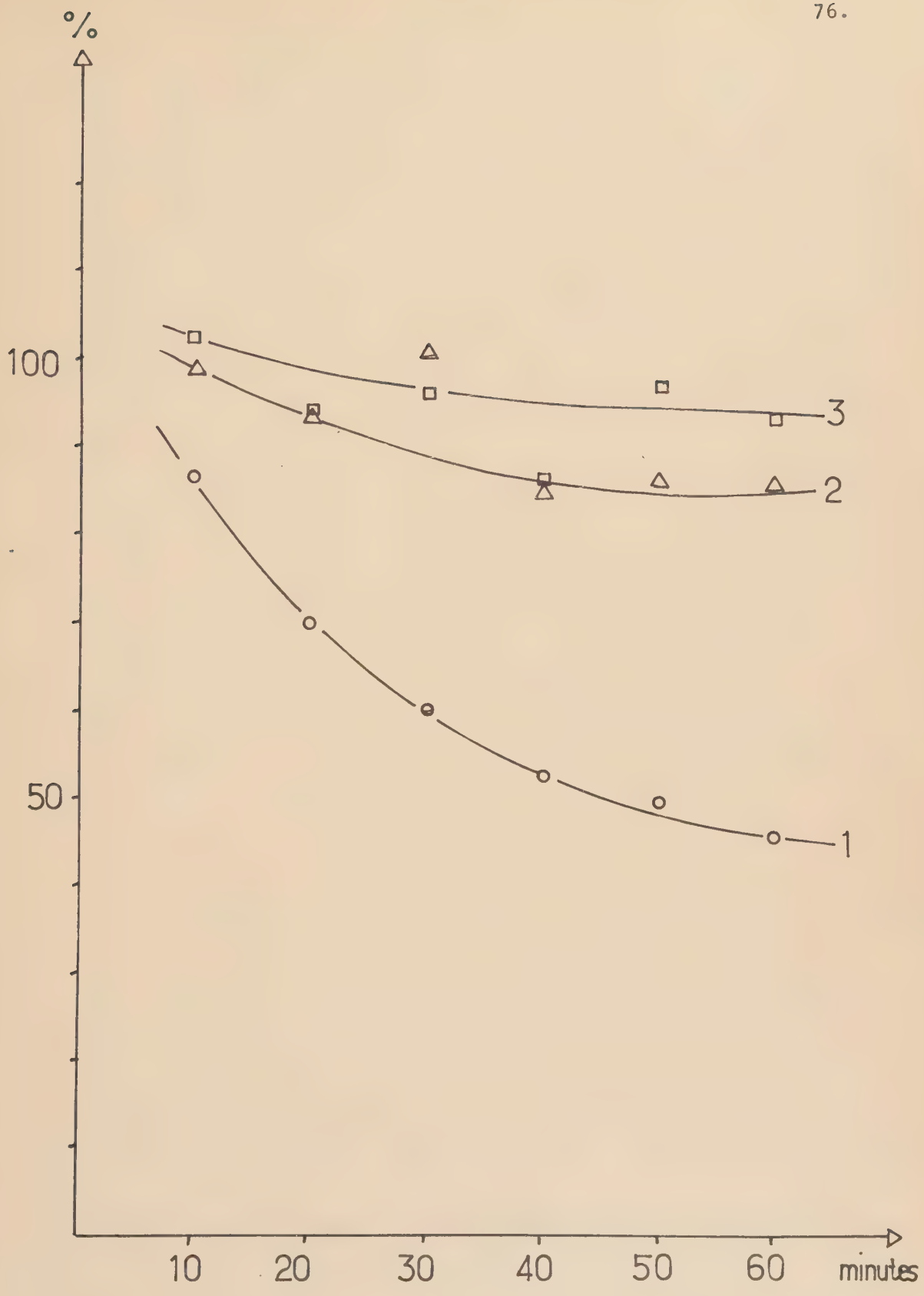


Figure **C** : Action du BMT à (o 10^{-4} M ; Δ 10^{-6} M ; □ 10^{-8} M) sur l'incorporation de la thymidine $^{14}CH_3$ dans l'ADN

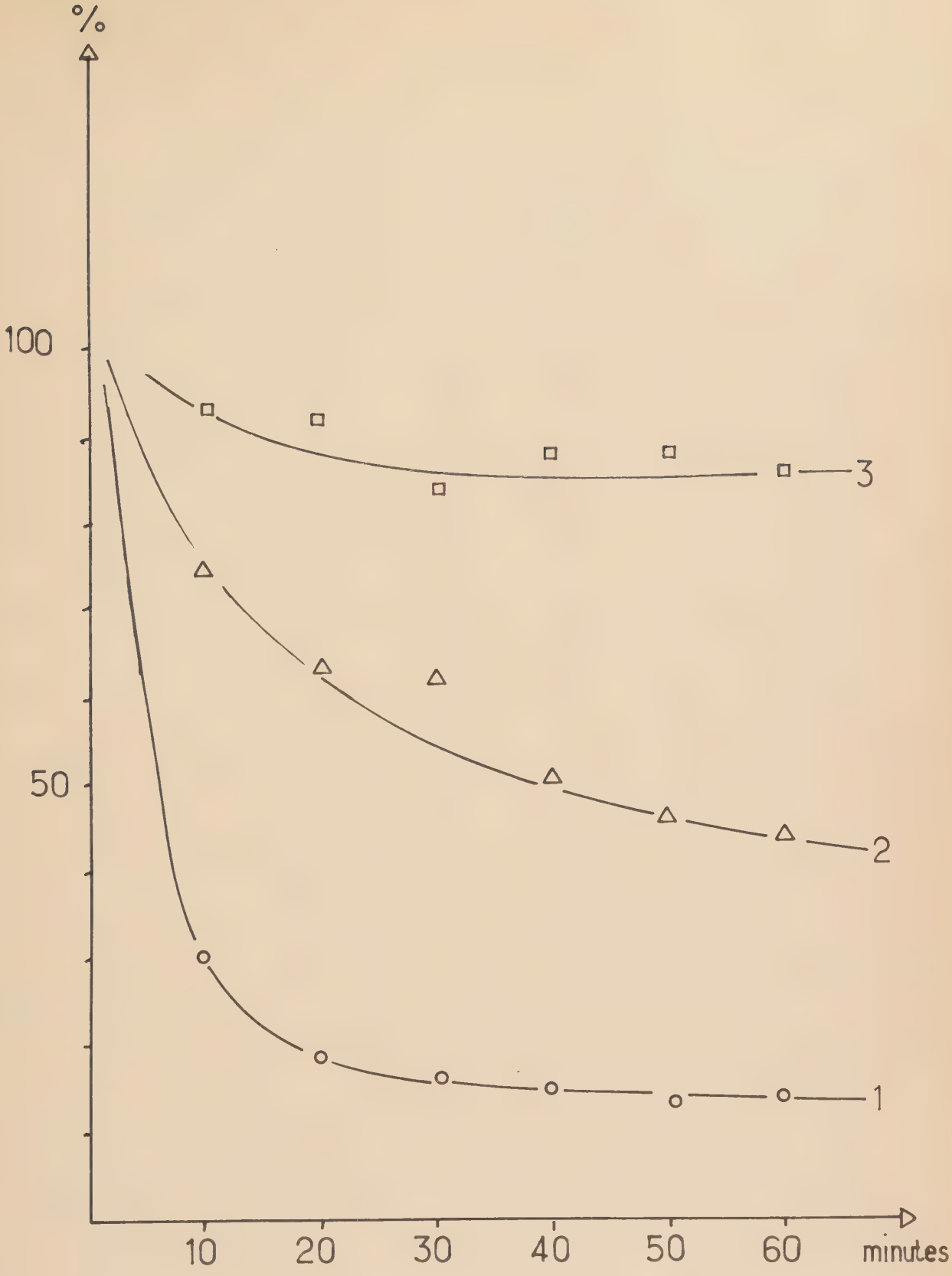


Figure **D** : Action du BBT (o 2.10^{-3} M ; Δ 2.10^{-4} M ; $1{,}5.10^{-5}$ M) sur l'incorporation de la thymidine $^{14}CH_3$ dans l'ADN.

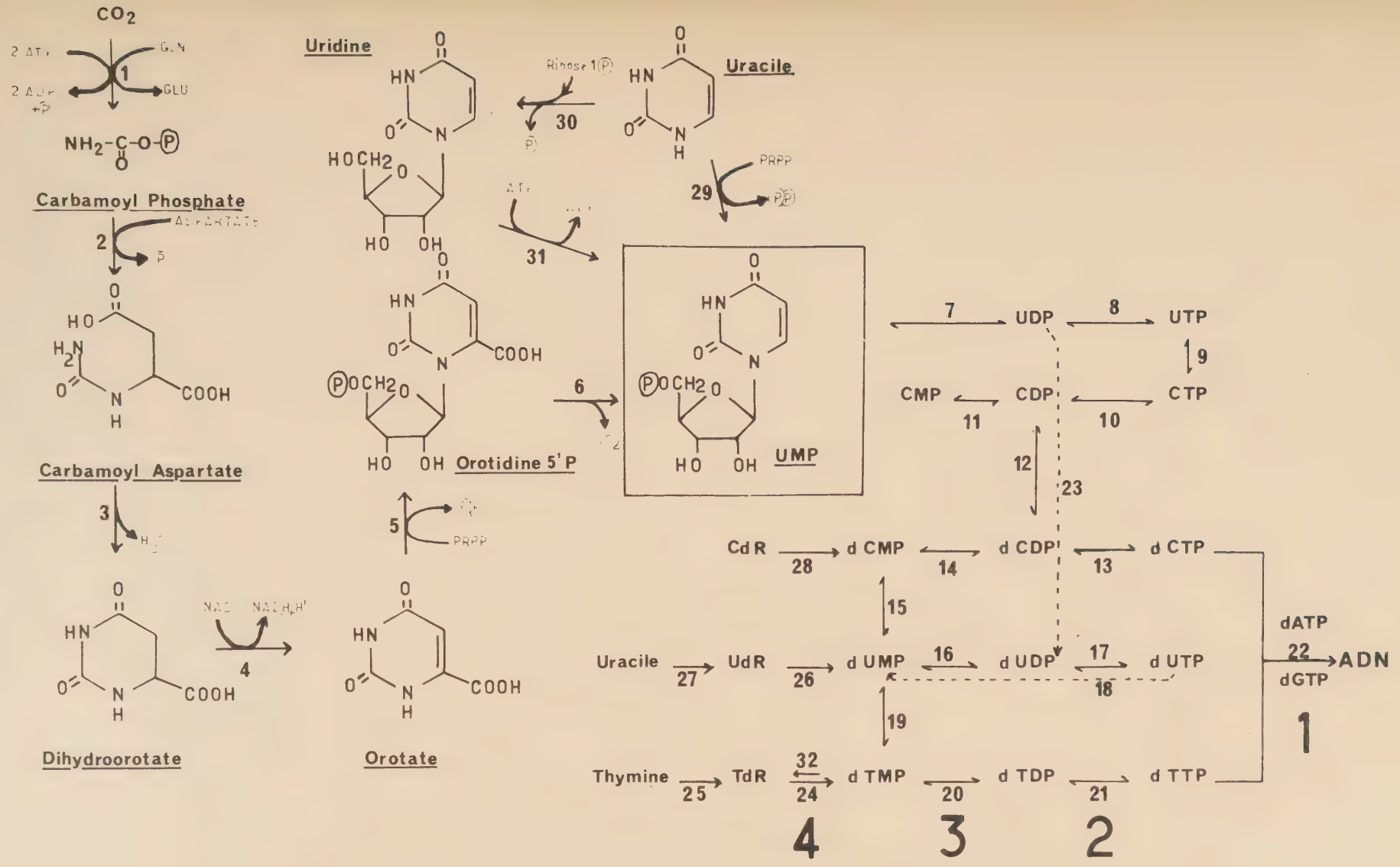


Fig. E SCHÉMA DE SYNTHÈSE DES NUCLÉOSIDES ET DES NUCLÉOTIDES DE PYRIMIDINES ET DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLÉIQUE.

ENZYMES.

1 Carbamyl phosphate synthétase
2 Aspartate transcarbamylase E.C. 2.1.3.27.
(carbamoyl phosphate : L aspartate carbamoyl transférase)
3 Dihydroorotase (L- 4,5 dihydroorotase amidohydrolase) E.C. 3.5.2.3.
4 Dihydroorotate deshydrogenase (L- 4,5 dihydroorotate : oxygène oxydoréductase). E.C. 1.3.3.1.
5 Orotidine 5' phosphate pyrophosphorylase (Orotidine 5' phosphate : pyrophosphate phosphoribosyl transférase). E.C. 2.4.2.10.
6 Orotidine 5' phosphate décarboxylase (Orotidine 5' phosphate carboxylase). E.C. 4.1.1.23.
7 UMP kinase
8 UDP kinase
9 UTP aminase (CTP synthétase ; UTP : ammonia lyase). E.C. 6.3.4.2.
10 CDP kinase
11 CMP kinase
12 Ribonucléotide réductase
13 dCDP kinase
14 dCMP kinase
15 dCMP deaminase (dCMP amidohydrolase). E.C. 3.5.4.12.
16 dUMP kinase
17 dUDP kinase
18 dUTPase
19 dTMP synthétase
20 dTMP kinase
21 dTDP kinase
22 ADN polymérase
23 Ribonucléotide réductase
24 Thymidine kinase (ATP : thymidine 5' phosphotransférase). E.C. 2.7.1.21.
25 Thymidine phosphorylase
26 Thymidine kinase (ATP : thymidine 5' phosphotransférase). E.C. 2.7.1.21.
27 Thymidine phosphorylase
28 Desoxycytidine kinase
29 UMP phosphorylase
30 Uridine phosphorylase
31 Uridine kinase
32 dTMP phosphatase

2) *Incorporation de la désoxyguanosine et de la désoxycytidine radioactives.*

Ces deux nucléosides radioactifs sont marqués par du Carbone 14 au niveau du Carbone 2.

Désoxycytidine $^{14}C_2$ (CB 36. Activité spécifique 40 mCi/mM. CEA Saclay)

Désoxyguanosine $^{14}C_2$ (CB 56. Activité spécifique 20 mCi/mM CEA Saclay).

Les tests effectués ont eu des résultats très nets : les analogues structuraux n'ont aucune influence sur l'incorporation de ces précurseurs dans l'ADN. (Témoin et essai présentent la même radioactivité) Tableau 1.

TABLEAU 1.

Précurseur \ R	10^{-4}M CH_3	10^{-4}M C_2H_5	10^{-4}M C_4H_9	10^{-4}M C_5H_{11}	10^{-3}M $CO-CH_3$	2 10^{-4}M $CO-C_6H_5$	% inhibition.
TdR $^{14}CH_3$	50	48	47	45	80	55	
GdR CdR $^{14}C_2$	0	0	0	0	0	0	

Il semble donc que la biosynthèse de novo de l'ADN dans les cellules d'ascites d'Ehrlich ne soit pas modifiée par la présence des analogues de thymidine. Ce résultat tend à éliminer la première hypothèse que nous avions formulée : ces composés n'agissent ni sur l'ADN polymérase ni sur la dTMP et la dTDP kinases.

Il nous reste à vérifier si la deuxième hypothèse est valable. Si celà était le cas, l'enzyme inhibé par les dérivés de thymidine serait la thymidine kinase.

Nous allons donc étudier de manière plus fine le rôle des analogues structuraux de thymidine sur la thymidine kinase des cellules d'Ascites

CHAPITRE II

DETERMINATION DU SITE D'ACTION DES INHIBITEURS. ETUDE DE LA THYMIDINE KINASE DES CELLULES D'ASCITES D'EHRLICH

I - PARTIE THEORIQUE.

A - Définitions.

Un enzyme est un catalyseur biologique qui permet la transformation d'un substrat en produit dans des conditions réactionnelles très douces.

L'activité d'un enzyme est déterminée par la quantité de substrat transformé (ou du produit formé) par unité de temps.

L'activité spécifique caractérise l'enzyme que l'on étudie. C'est la quantité de substrat transformé par minute et par milligramme de protéine.

B - Cinétiques enzymatiques.

La première étude de la cinétique enzymatique a été suivie par Victor Henri, en 1904. Mais la première analyse mathématique a été faite par Mickaelis et Menten en 1913.

Leur étude mathématique de la réaction :

$$E + S \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k3} E + P$$

en ayant posé $v = k(es)$, a abouti à l'équation :

$$v = k3.C = k3 \frac{ES}{K_m + S}$$

dite première équation de Mickaélis et Menten.

Cette équation est beaucoup plus connue sous la forme :

$$v = \frac{VmS}{K_m + S}$$

Vm : vitesse maximum

K_m : constante de Mickaelis

Diverses représentations graphiques ont pu être obtenues à partir de cette équation. Les plus utilisées sont au nombre de quatre :

- Représentation directe (1) $V = f(S)$

Cette méthode de détermination des constantes caractéristiques de l'enzyme a des inconvénients : le palier correspondant à Vm n'est pas très net, et K_m n'est pas précis.

On a donc cherché à linéaliser cette équation.

- Représentation de Eadie et Augustinson (2)

$$v = Vm - K_m \left(\frac{V}{s}\right)$$

Cette représentation présente un grand intérêt lorsqu'on a un mélange d'enzymes car on observe des ruptures de pente.

- Représentation de Lineweaver et Burk (3)

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{Vm} + \frac{K_m}{Vm}\left(\frac{1}{S}\right)$$

Cette méthode est la plus utilisée car on obtient de bonnes valeurs de Vm et K_m.

- Représentation de Dixon (4)

$$\frac{s}{v} = \frac{K_m}{Vm} + \frac{1}{Vm} \quad (s)$$

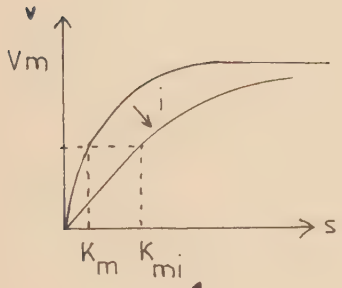
Ces différentes déterminations graphiques permettent d'obtenir les constantes caractéristiques des enzymes : Vm et K_m.

C - Action des inhibiteurs sur les enzymes.

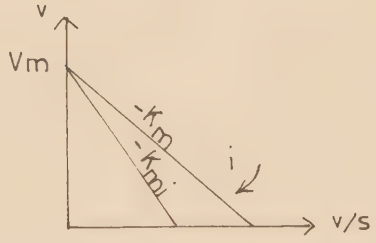
Dans le métabolisme, les enzymes sont régulés par des effecteurs (inhibiteurs ou activateurs), selon l'état dans lequel se trouve la cellule, de telle sorte que l'équilibre soit parfait.

Il existe diverses catégories d'inhibiteurs des enzymes. On les a classés selon leur comportement. Certains exercent leur activité en modifiant l'affinité de l'enzyme pour le substrat (modification de K_m et Ks), d'autres diminuent le pouvoir catalytique de l'enzyme donc la vitesse maximum. Il en existe qui jouent sur les deux paramètres : ils appartiennent à la catégorie d'effecteurs de type non pur.

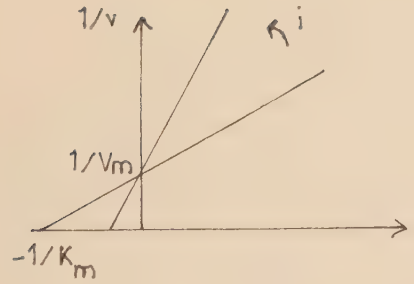
Dans le type I, l'inhibiteur affecte l'affinité de l'enzyme pour le substrat. K_m et Ks sont modifiés et on remarque que l'action de l'inhibiteur se traduit par une augmentation de la valeur du K_m. On a une inhibition de type compétitif.



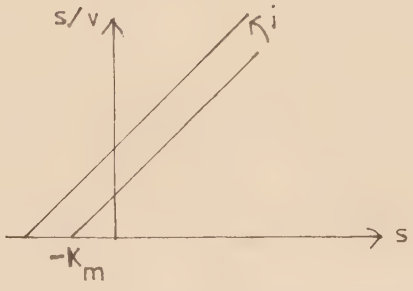
1



2



3

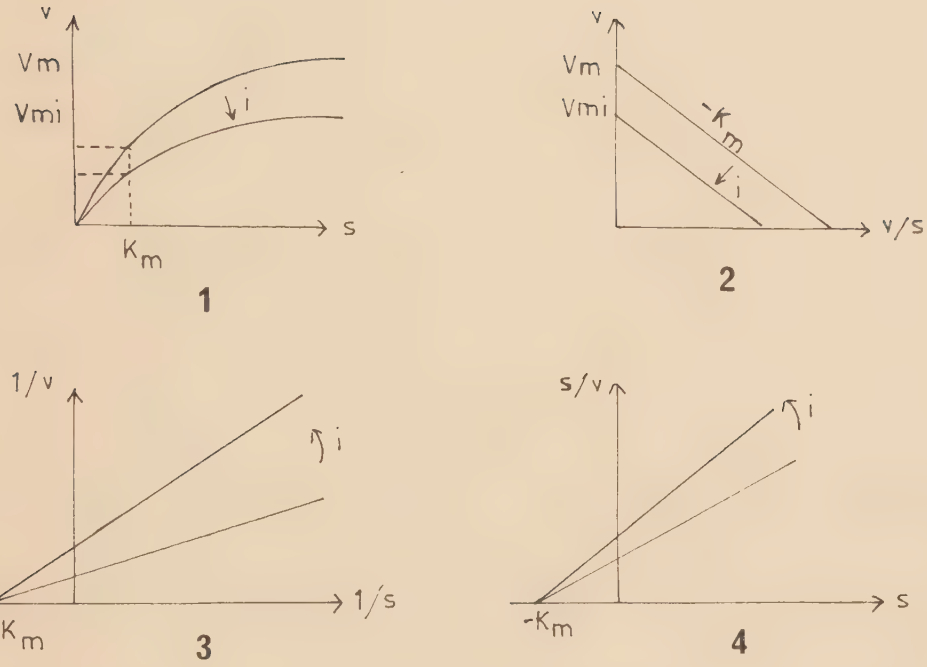


4

Type compétitif

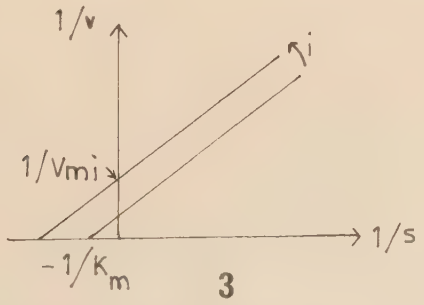
Dans le type II, on remarque une modification au niveau de la vitesse. Vm diminue tandis que K_m n'est pas modifié.

C'est le cas de l'inhibition non compétitive.

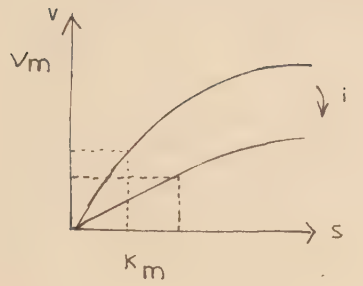


Type non compétitif

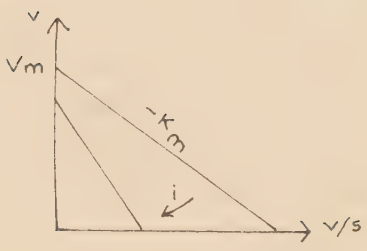
A côté de ces deux grands types, il existe des inhibiteurs de type mixte et de type incompétitif. Ces deux systèmes sont plus difficiles à analyser.



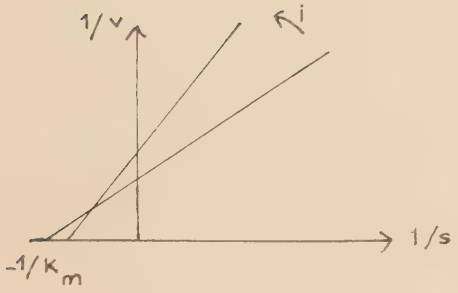
Type incompetitif



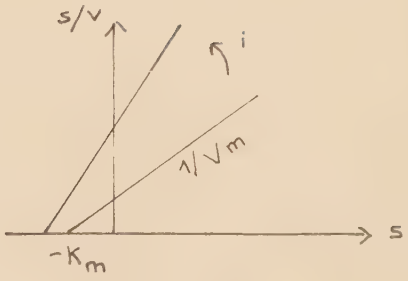
1



2



3



4

Type mixte

L'action des inhibiteurs et le type d'inhibition sont déterminés par les mêmes études graphiques que lorsqu'on étudie un enzyme seul. Ki est la constante spécifique de ces effecteurs. C'est la constante de formation du complexe EI au cours de la réaction $E + I \rightleftarrows EI$.

$$Ki = \frac{(E)\ (I)}{(EI)}$$

Elle caractérise l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur, et elle peut être déterminée graphiquement de plusieurs manières :

- Représentation Lineweaver et Burk.

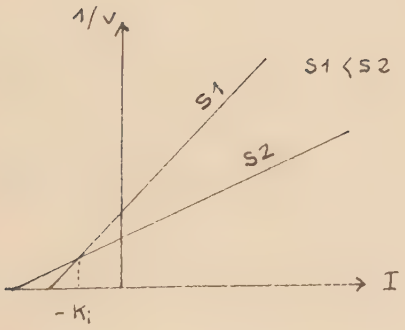
Compétition pure : $K_{mi} = K_m\ (1 + i/Ki)$

non compétition pure : l'ordonnée à l'origine est multipliée par $(1 + i/Ki)$.

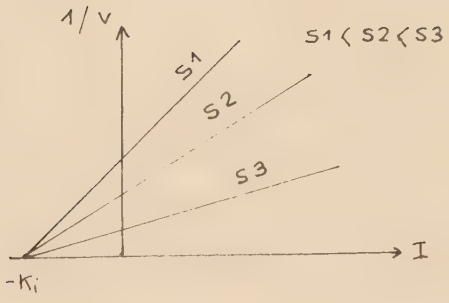
- Représentation de Dixon.

$1/V = f(I)$

On obtient deux types de courbes selon que l'on a affaire à une inhibition compétitive ou non compétitive.



Compétition



Non compétition

Ces différentes données théoriques vont nous permettre d'étudier la thymidine kinase des cellules d'Ascites d'Ehrlich et l'action des analogues structuraux synthétisés sur cet enzyme.

II - ETUDE EXPERIMENTALE.

A - Extraction de la thymidine kinase.

Les études de Cory et Whitford en 1972 (21) sur l'activité des enzymes impliqués dans la biosynthèse de l'ADN des cellules d'Ascites d'Ehrlich ont montré qu'elle se situait à son maximum d'intensité entre le

3e et le 5e jour. Mais au cours des cinq premiers jours après inoculation,le volume de fluide ascitique chez les souris est très faible. Aussi avons-nous décidé d'effectuer le prélèvement de cellules et l'extraction des enzymes le 6e jour après inoculation.

La méthode d'extraction de la fraction enzymatique globale est classique (13, 14, 19, 77, 82).

Les fluides ascitiques de quinze souris sont rassemblés et lavés avec du KCl 0,154 M, 0°C. Toutes les étapes sont effectuées à basse température.

Au culot cellulaire obtenu après le 3e lavage sont ajoutés 2 volumes de KCl 0,154 M et la suspension cellulaire est ultrasonnée (30 sec, 50 W) avec un appareil à ultra-sons BRANSON.

La suspension est alors ultracentrifugée à 105000 $\vec{g}$ dans une ultracentrigugeuse BECKMAN Spinco L 2/50 B avec un rotor SW 40.

Le surnageant (15 cc environ) est conservé par volumes de 1 ml dans un réfrigérateur à azote liquide. L'activité enzymatique est conservée 1 mois.

La concentration en protéines totales est déterminée par la méthode au biuret (biochemica test combination - Protéines totales - Boehringer Mannkeim - GMBH). Elle est de l'ordre de 20 mg Protéines/ml.

B - Conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme.

1) pH optimum : l'activité de la thymidine kinase des extraits de différentes tumeurs animales (14) et d'Escherichia Coli (55) montre un pH optimum à 8,0 - 8,2 avec une chute rapide de l'activité dans la partie acide. A pH 10, l'activité résiduelle représente encore 80 % de l'activité optimale pour les cellules animales.

2) *Température optimum* : l'activité enzymatique croît régulièrement de 30°C à 40°C. Cependant nous effectuons nos études à 37°C, température habituelle de fonctionnement de cet enzyme chez la souris.

3) *Besoin en magnésium et ATP* : l'enzyme nécessite presque exclusivement du magnésium Mg^{++} en tant que cation divalent. Il lui est fourni dans le milieu sous forme de chlorure de magnésium MgCl2. De plus au cours de la réaction de phosphorylation l'enzyme a besoin d'ATP. Deux molécules d'ATP sont indispensables pour phosphoryler une molécule de thymidine : l'une sert en tant que substrat pour donner du phosphate, l'autre agit en tant qu'activateur de l'enzyme.

C - Méthode expérimentale.

Le but de cette expérience est de phosphoryler de la thymidine, marquée sur le méthyle par du carbone 14, par la thymidine kinase en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs, de séparer les nucléotides radioactifs formés et de déterminer l'activité de l'enzyme pour chaque système substrat - Inhibiteur.

1) Matériel et Produits.

La composition du milieu d'incubation où va s'effectuer la phosphorylation de la thymidine est la suivante :

ATP	165 mg
MgCl2	60 mg
3 phosphoglycerate	70 mg
Tampon TRIS HCl	360 mg
Eau distillée	20 ml.

Le pH est ramené à 8,2 par addition d'acide chlorhydrique fumant.

Le substrat utilisé est la thymidine $^{14}CH_3$. Elle est en solution dans un mélange éthanol-eau (50 %) (CMM 162 ; activité spécifique : 55,3 mCi/mM).

Les concentrations sont déterminées après purification de la thymidine par chromatographie de couche mince de gel de silice et élution par les solvants 1 et 2 (cf partie 1, chap. 3).

L'inhibiteur est ajouté au mélange réactionnel sous forme d'une solution aqueuse dont la concentration varie de 10^{-3} ML^{-1} à 10^{-4} ML^{-1}.

Une fois formés, les nucléotides sont séparés par chromatographie ascendante sur papier. Le support utilisé est la cellulose DEAE DE 81, l'éluant un mélange d'acide formique 4N - formiate d'ammonium 0,1 M (19,40). Des essais préalables de séparation des nucléotides par ce système se sont révélés très satisfaisants. Le Rf correspondant à chaque composé est :

Produit	:	TdR	TMP	TDP	TTP
Rf	:	0,87	0,49	0,20	0,05

Les taches radioactives sont repérées par autoradiographie. Pour celà, on met en contact la chromatographie avec le papier photographique Kodak Kodirex. La durée de contact est de 18 à 20 heures.

Les taches sont alors découpées, mises dans des flacons de comptage. On ajoute le mélange scintillant à base de dioxanne et on donne à compter. On détermine ainsi le pourcentage de produit transformé, par conséquent, la quantité de thymidine phosphorylée pour chaque essai. Connaissant le temps de réaction, la concentration en protéines totales, on peut déterminer la vitesse de réaction.

2) Phosphorylation de la thymidine.

A 200 µl du milieu d'incubation, on ajoute 30 µl de solution aqueuse d'inhibiteur du 30 µl du KCl 0,154 M (témoin) et 10 µl de thymidine radioactive.

Les tubes sont préincubés 30 minutes, puis la réaction démarre par addition de 100 µl d'extrait enzymatique. Les tubes sont alors incubés 30 mn. A la fin de l'incubation, ils sont chauffés 2 mn dans l'eau bouillante pour stopper la réaction puis ils sont centrifugés.

Un échantillon de 20 µl de surnageant est déposé sur le papier chromatographique et séché. Les papiers sont ensuite suspendus dans des cuves Desaga et les nucléotides mis à migrer sur 12 cm environ. Les chromatographies sont ensuite séchées et mises en autoradiographie.

D - Etude graphique de la thymidine kinase et de ses inhibiteurs.

Les méthodes graphiques de détermination des constantes utilisées sont celles de Lineweaver et Burk (Vm, K_m, K_{mi}) et de Dixon (Ki).

L'étude de la vitesse de réaction en fonction de la variation de la concentration en substrat et de la variation de la concentration en inhibiteur permet de déterminer pour chaque composé les constantes caractéristiques et le type d'inhibition observé.

L'étude v = f (s) pour une concentration en inhibiteur nulle a permis de déterminer le K_m et le Vm de la thymidine kinase.

1) Constante de Mickaelis et vitesse maximum.

Grâce à l'utilisation de la représentation de Lineweaver & Burk (45), la constante de Mickaelis (K_m) a pu être déterminée. Le K_m de la thymidine kinase des cellules d'ascites d'Ehrlich est de $5,2.10^{-6}$M. Cette valeur, à notre connaissance non déterminée, semble en bon accord avec les valeur de K_m des thymidines kinases provenant de sources variées :

Source de l'enzyme	K_m	Ref
Escherichia coli	$5,6.10^{-6}$ M L^{-1}	13
Tumeur de Novikoff	$2,7.10^{-6}$ M L^{-1}	14
Tumeur MDAB	$3,2.10^{-6}$ M L^{-1}	14
Tumeur de Walker.	$3,7.10^{-6}$ M L^{-1}	14
Tumeur d'Ehrlich.	$5,2.10^{-6}$ M L^{-1}	

Constantes de Mickaelis de thymidine pour la thymidine kinase.

De plus la représentation de Lineweaver et Burk a permis de déterminer avec précision la deuxième constante caractéristique de la thymidine kinase des cellules ascites d'Ehrlich :

Vm = 0,16 nM/mg Protéines totales x mn

2) Action des analogues structuraux de la thymidine.

Les analogues de désoxyribonucléosides de thymidine inhibent la formation de dTMP d'une manière notable. Tous ces composés présentent une activité voisine, liée à la forme substituée du nucléoside. Est-ce la substitution par le brome, ou la présence du substituant en 6 qui confère son activité à la molécule ? Pour répondre à cette question nous avons testé l'action de l'éthoxy-6 dihydro-5,6 thymidine.

Le composé inhibe la thymidine kinase d'une manière identique, dans la même gamme de concentration. C'est donc la présence du groupement en 6 qui attribue à la molécule cette propriété d'inhibiteur.

La nature de l'inhibition produite par les analogues de thymidine a été établie par la méthode de Lineweaver et de Burk (fig. 1, 2, 3 A). Ces effecteurs inhibent compétitivement la thymidine kinase. Les constantes d'inhibition pour l'association de l'inhibiteur et de l'enzyme Ki, ont été déterminées par la méthode de Dixon (fig. 1, 2, 3 B). Elles sont toutes du même ordre de grandeur.

Dérivés	Ki
Bromo-5 methoxy-6 dihydro-5,6 thymidine	$0,23.10^{-4}$ M L^{-1}
Bromo-5 ethoxy-6 dihydro-5,6 thymidine	$0,24.10^{-4}$ M L^{-1}
Bromo-5 butoxy-6 dihydro-5,6 thymidine	$0,30.10^{-4}$ M L^{-1}
Bromo-5 acetoxy-6 dihydro-5,6 thymidine	$0,40.10^{-4}$ M L^{-1}
Bromo-5 benzoyloxy-6 dihydro-5,6 thymidine	$0,28.10^{-4}$ M L^{-1}

Constantes d'inhibition des analogues.

3) Conclusions.

La thymidine kinase (ATP : thymidine 5'-phosphate transférase) des cellules d'ascites d'Ehrlich présente les mêmes propriétés (vitesse maximum, constante de Mickaelis, réponse aux différents paramètres ; pH, tp, ...) que celles provenant de sources variées. Les composés de saturation de la double liaison 5,6 de la thymidine sont pour elle des inhibiteurs compétitifs. L'influence stérique du groupement en 6 est faible, mais la présence de ce substituant semble indispensable pour que ces composés acquièrent la propriété d'inhibiteurs. On a pu en outre remarquer que les isomères levogyres et dextrogyres ne montraient pas de différence dans leurs activités biologiques.

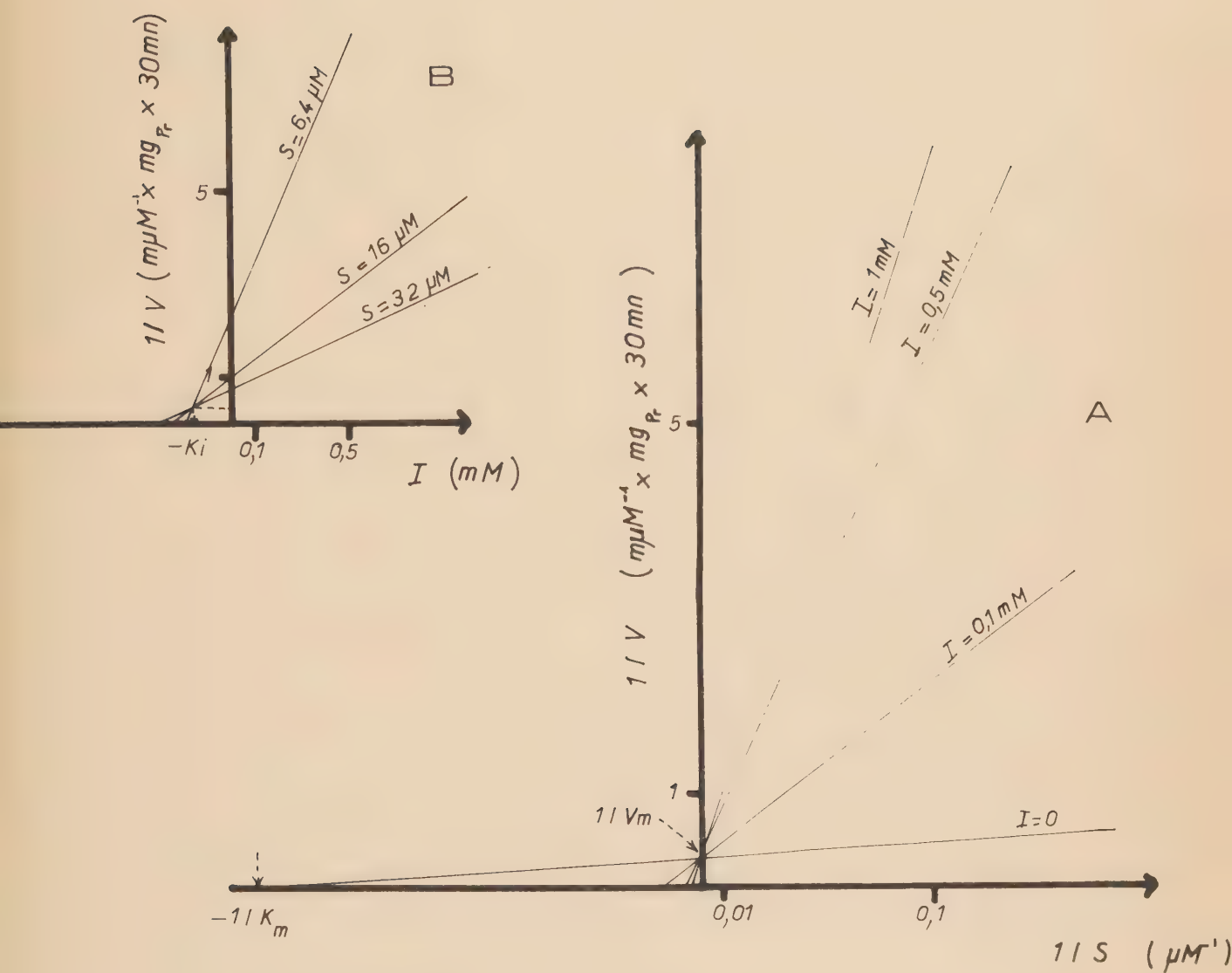
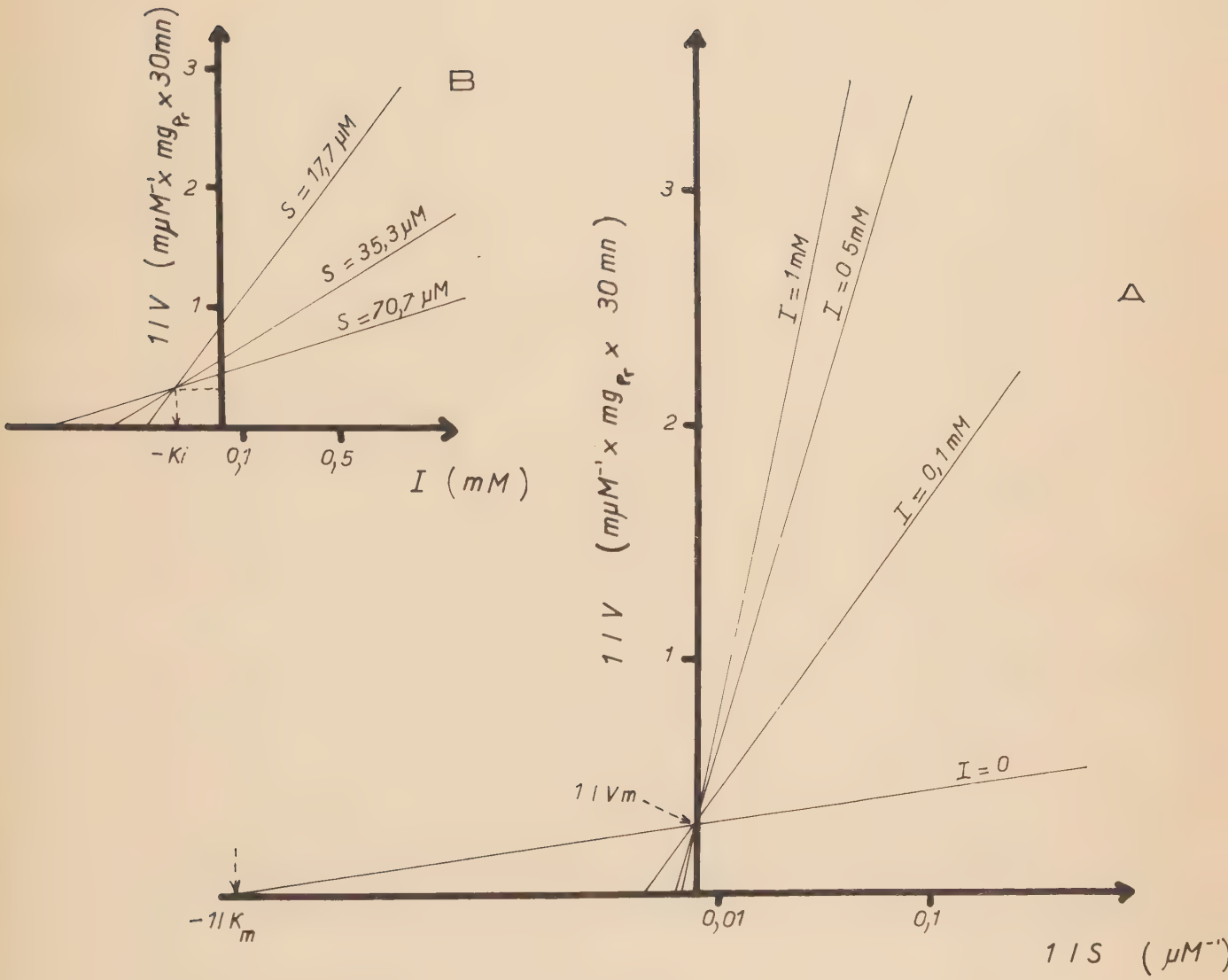


Fig. 1 BROMO-5, DIHYDRO-5,6, METHOXY-6 THYMIDINE



. 2 BROMO-5, DIHYDRO-5,6, ETHOXY-6 THYMIDINE

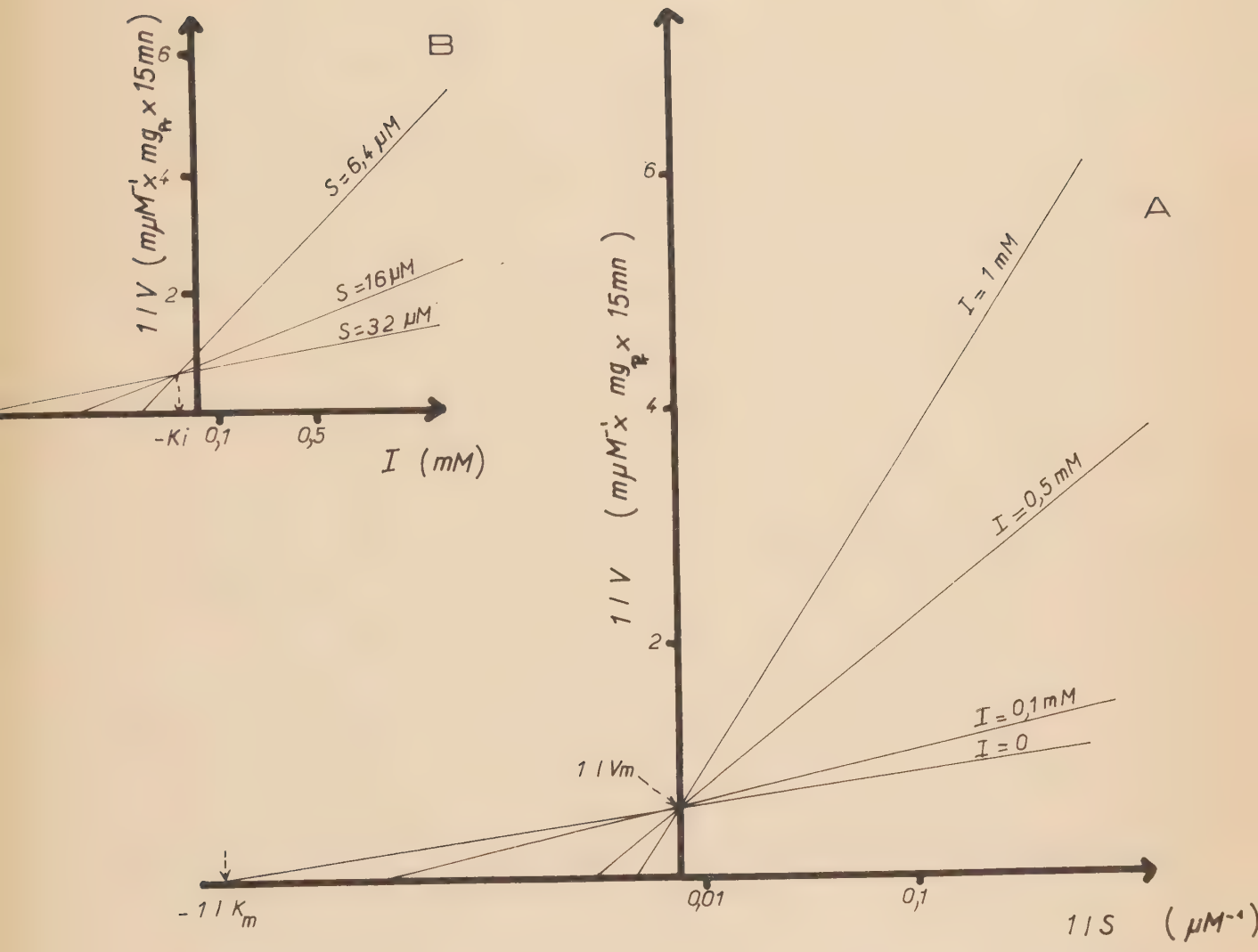


Fig. 3 BENZOYLOXY-6, BROMO-5, DIHYDRO-5,6 THYMIDINE

CONCLUSION GENERALE.

Les analogues structuraux des nucléosides et des nucléotides de purines et de pyrimidines naturels sont des composés qui présentent un grand intérêt, aussi bien en biologie qu'en médecine.

Les études relatives à de telles substances ont conduit à la synthèse de composés très variés, les modifications structurales pouvant intervenir sur la base ou sur le sucre. Les propriétés biologiques de ces produits ne se situent pas dans un domaine restreint. En effet, ces analogues structuraux agissent chacun sur des enzymes précis du métabolisme des acides nucléiques.

Deux nouvelles familles de ce type de substances ont été synthétisées :

- (Desoxy 2' βD erythropentofuranosyl)-1, bromo-5 alkoxy-6, dihydro 5,6 thymine trans
- (Desoxy 2' βD erythropentofuranosyl)-1, bromo-5, alcoyloxy-6, dihydro 5,6 thymine trans.

Ces composés ont été caractérisés d'une manière complète. A côté des déterminations classiques (analyse centésimale, point de fusion, pouvoir rotatoire) les analyses spectrales ont été déterminantes.

Les spectroscopies ultra violette et infra rouge ont apporté des renseignements sur la structure des molécules qui ont été confirmées par la spectroscopie RMN et par la spectrométrie de masse.

De plus, la spectroscopie RMN a permis de montrer la similitude existant entre tous les diastéréoisomères dextrogyres et tous les diastéréoisomères lévogyres. Elle a permis en outre, de montrer les différences structurales entre les deux diastéréoisomères d'un même composé.

. différence de conformation autour de la liaison N-glycosidique

. différence de conformation du cycle osidique.

Outre la confirmation de la masse moléculaire, la spectrométrie de masse a permis d'établir les schémas de dégradation de ces molécules.

L'étude des effets biologiques de ces composés a confirmé l'action d'inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques, des analogues structuraux des molécules naturelles.

Ces deux familles de substances sont des inhibiteurs compétitifs de la thymidine kinase (ATP : Thymidine 5' phosphotransférase) des cellules d'Ascites d'Ehrlich. Elles agissent donc au niveau du métabolisme de sauvetage de ces cellules et au niveau de la réutilisation des produits du catabolisme cellulaire.

Tous ces composés ont une activité inhibitrice semblable, qui est liée à la présence d'un groupement en position 6. L'influence stérique de ce substituant est très faible.

De telles substances ont été conçues et synthétisées dans le but de rechercher des composés capables de freiner ou même de stopper la prolifération de cellules cancéreuses du type Ascites d'Ehrlich, chez les souris. On a pu montrer in vitro que ces substances possèdent des propriétés d'antimétabolites. Il reste à étudier in vivo l'évolution des tumeurs ascitiques d'Ehrlich et la survie des souris traitées par de tels composés.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ATKINSON M.R., ECKERMANN G., STEPHENSON J.
Formation of 6-thioxantosine 5' phosphate from 6-mercaptopurine and from 6-thioxanthine in Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim. Biophys. Acta 108, (1965) 320.

2 - ATKINSON M.R., MORTON R.K., MURRAY A.W.
Inhibition of adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from Ehrlich ascites tumor cells by 6-thioinosine 5' phosphate.
Biochem. J. 92 (1964) 398.

3 - BAKER B.R., SCHWAN T.J., SANTI D.V.
Non classical antimetabolites- Inhibition by nucleoside derivatives.
J. Med. Chem. 9 (1966) 66.

4 - BALIS E.M. et Coll.
J. Biol. Chem. 196 (1952) 729.

5 - BALIS E.M., HYLIN V., COULTAS M.K., HUTCHINGSON D.J.
Metabolism of resistant mutants of Streptococcus faecalis. III : The action of 6-mercaptopurine.
Cancer Res. 18 (1958) 440.

6 - BALIS E.M.
Antagonists and nucleic acids.
10 (1968) North Holland. Amsterdam.

7 - BARCLAY R.K., GARFINKEL E., PHILLIPPS M.A.
Effect of 6-diazo-5-oxo-L-Norleucine on the incorporation of precursors into nucleic acids.
Cancer Res. 22 (1962) 802.

8 - BENNETT L.L., SIMPSON L., GOLDEN J., BARKER T.L.
The primary site of inhibition by 6-mercaptopurine on the purine biosynthetic pathway in some tumors in vivo.
Cancer Res. 23 (1963) 1574.

9 - BLOCK A., NICHOL C.A.
Inhibition of ribose-phosphate pyro-phosphokinase activity by decoyinine, an adenine nucleoside.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 16 (1964) 400.

10 - BOLLUM F.J., POTTER V.R.
Incorporation of thymidine into deoxyribonucleic acid by enzymes from rat tissues.
J. Biol. Chem. 233 (1958) 478.

11 - BREITMAN T.R.
The feedback inhibition of thymidine kinase.
Biochim. Biophys. Acta 67 (1963) 153.

12 - BRESNICK E., HITCHINGS G.H.
Feedback control in Ehrlich ascites cells.
Cancer Res. 21 (1961) 105.

13 - BRESNICK E., MAINIGI K.D., BUCCINO R., BURLESON S.S.
Studies on deoxythymidine kinase of regenerating rat liver and Escherichia coli.
Cancer Res. 30 (1970) 2502.

14 - BRESNICK E., THOMPSON U.B.
Properties of deoxythymidine kinase partially purified from animal tumors.
J. Biol. Chem. 240 (10) (1965) 3967.

15 - BROCKMAN R.W. et coll.
Cancer Res. 19 (1959) 177.

16 - CADET J., TEOULE R.
Oxydation controlée de la thymidine et de l'acide thymidylique par le permanganate.
C.R. Acad. Sci. Paris C, 271, 1632 (1970)

17 - CADET J., TEOULE R.
Radiolyse de la thymidine en solution aqueuse aérée.
Comm. Soc. Chim. Fr. Lyon Avril 1971 n° 7b, abstract n° 44.

18 - CHANG C., ROTH B.
Progress in medicinal biochemistry.
7 chap. 6 (1970). Ellis & West Eds. (Butterworths).

19 - CHI-BOM CHAE, DOBBINS C.M., IRVIN L.J., PIANTADOSI C.
Inhibition of thymidylic acid kinase by 5-substituted pyrimidines.
Biochem. Pharmacol. 21 (1972) 761.

20 - CIHAK A., SKODA J., SORM F.
Inhibition of biosynthesis of the nucleic acid pyrimidine bases by N-fomyl biuret, a degradation product of 5-azauracil.
Biochim. Biophys. Acta 72 (1963) 125.

21 - CORY Jh. C., WHITFORD T.W. Jr.
Ribonucleotide reductase and DNA synthesis in Ehrlich ascites tumor cells.
Cancer Res. 32 (1972) 1301.

22 - CUNNINGHAM K.G.
J. Med. Chem. (1951) p. 2299.

23 - DELAMORE I.W., PRUSOFF W.H.
Biochem. Pharmacol. 11 (1962) 101.

24 - DOWNIE I.M., LEE J.B., NOLAN T.J., ALLEN R.M.
Sugar with potential antiviral activity.
Tetrahedron 25(11) (1969) 2339.

25 - DUSCHINSKY R.
5,6-substituted dihydropyrimidines.
Brevet U.S. 3,502,675 (1970).

26 - DUSCHINSKY R., GABRIEL T., TAUTZ W., NUSSBAUM A., HOFFER M., GRUNBERG E., BURCHENAL J.H., FOX J.J.
Nucleosides. XXXVII : 5,6-substituted 5-fluoro dihydropyrimidines and their 2' deoxyribonucleosides.
J. Med. Chem. 10(1) (1967) 47.

27 - DYER J.R.
Spectroscopie d'absorption appliquée aux composés organiques.
DUNOD Ed. Paris.

28 - ELION G.B., CALLAHAN S., WAYNE-RUNDLES R., HITCHINGS G.H.
Relationship between metabolic fates and antitumor activities of thiopurines.
Cancer Res. 23 (1963) 1207.

29 - ELLIS D.B., LEPAGE G.A.
Molecular Pharmacol. 1 (1965) 231.

30 - GALE E.F., CUNDLIFFE E., REYNOLDS P.E.
The molecular basis of antibiotic action.
(1972) Wiley interscience.

31 - GRAV H.J., SMELLIE R.M.S.
The mechanism of formation of thymidine 5'-triphosphate by enzymes from Landshutz ascites tumor cells.
Biochem. J. 89 (1963) 486.

32 - GUARINO A.J.
Antibiotics. 1 Mechanism of action.
Gottlieb & Shaw Eds. Springer Verlag. Heidelberg.

33 - GURSKY G.V.
Molecular Biology 3 (1970) 592.

34 - HAMILTON L.D., FULLER C., REICH E.
X-ray diffraction and molecular model building studies of the interaction of actinomycin with nucleic acid.
Nature (London) 198 (1963) 538.

35 - HEIDELBERGER C.
Progress in nucleic acids and molecular biology 4 (1965) 1

36 - HEIDELBERGER C., ANDERSON S.N.
Cancer Res. 24 (1964) 1979

37 - HEIDELBERGER C.
Cancer Chemotherapy with purine and pyrimidine analogues.
Ann. Rev. Pharmacol. 7 (1967) 101.

38 - HORI M.
J. Antibiotics (Tokyo) A17 (1964) 96.

39 - HRUSKA F.
Molecular conformation of orotidine, a naturally occuring nucleoside, in the Syn conformation in aqueous solution.
J. Amer. Chem. Soc. 93 (1971) 1795.

40 - IVES D.H.
Feedback inhibition of thymidine kinase by dTTP.
J. Biol. Chem. 238(4) (1963) 1466.

41 - JAGGER D.V., KREDICH N.M., GUARINO A.J.
Inhibition of Ehrlich mouse ascites tumor growth by Cordycepin.
Cancer Res. 21 (1961) 216

42 - KACZKA E.A., TRENNER. N.R., ARISON B., WALKER R.W., FOLKERS K.
Identification of Cordycepin, a metabolite of Cordyceps militaris, as 3'-deoxyadenosine.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 14 (1964) 456.

43 - KLENOW H.
Inhibition by Cordycepin and 2-deoxyglucose of the incorporation of ^{32}P orthophosphate into the nucleic acids of Ehrlich ascites tumor cells in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 76 (1963) 354.

44 - LERMAN L.S.
Acridine mutagens and DNA structure.
J. Cell. Comp. Physiol. 64 (1964) suppl. 1, 1

45 - LINEWEAVER H., BURK D.
The determination of the enzyme dissociation constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658.

46 - LOUX H.M.
Substituted hydrouracils as herbicids.
Brevet U.S. 3,322, 526 (1967).

47 - LOUX H.M.
Herbicidal hydrouracils.
Brevet français 1,479,259 (1967).

48 - LUTZ A., WALWORTH B., FEENY R.
Herbicidal hydrouracils.
Brevet allemand 1,930,776 (1969).

49 - MALEY G.F., MALEY F.
The purification and properties of deoxycytidylate deaminase chick embryo extract.
J. Biol. Chem. 239 (1964) 1168.

50 - MANS R., NOVELLI D.
Measurement of the incorporation of radioactive aminoacids into proteins by a filter paper disk method.
Arch. Biochem. Biophys. 94 (1961) 48.

51 - MASSOT R., ULRICH J.
XV colloquium spectroscopicum internationale.
Madrid, Mai 1969.

52 - MATHEWS C.K., COHEN S.S.
Inhibition of phage induced thymidylate synthetase by 5-fluorodeoxyuridylate.
J. Biol. Chem. 238 (1963) 367.

53 - NELSON D.J., CARTER C.E.
Molecular Pharmacol. 2 (1966) 248.

54 - NOFRE C., OGIER M.H
Préparation et propriétés de 1'hydroxy-6 dihydrothymine.
C.R. Acad. Sci. Paris C, t263 (1966).

55 - OKAZAKI R., KORNBERG A.
Deoxythymidine kinase of E. coli
I : purification and some properties of the enzyme.
J. Biol. Chem. 239(1) (1964) 269.

56 - OKAZAKI R., KORNBERG A.
Deoxythymidine kinase of E. coli
II : kinetics and feedback control.
J. Biol. Chem. 239(1) (1964) 275.

57 - OVERGAARD-HANSEN K.
The inhibition of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate by Cordycepin triphosphate in extracts of Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim. Biophys. Acta 80 (1964) 504.

58 - PITTILIO R.F., HUNT D.E.
Antibiotics. 1 Mechanism of action (1967)
Gottlieb & Shaw Eds. Springer Verlag.Heidelberg.

59 - PRUSOFF W.H.
Recent advances in chemotherapy of viral deseases.
Pharmacol. Rev. 19 (1967) 209.

60 - PRUSOFF W.H.
Cancer Res. 20 (1960) 92.

61 - RABKIN M.T., FREDERICK E.W., MYRON L., SMITH L.H. Jr.
Pyrimidine metabolism in man. V : The measurement in vivo of the biochemical effect of antineoplastic agents in animal and in human subjects.
J. Clin. Invest. 41 (1962) 871.

62 - REYES P., HEIDELBERGER C.
Molecular Pharmacol. 1 (1965) 14.

63 - ROTTMAN F., GUARINO A.J.
The inhibition of purine biosynthesis de novo in Bacillus subtilis by Cordycepin.

64 - ROY-BURMAN J.
Analogues of Nucleic acids components (recent results in Cancer Res. 25)
Springer Verlag. Heidelberg (1970)

65 - SARTORELLI A., BOOTH B.A.
Biochem. Pharmacol. 5 (1960) 245.

66 - SCHWEITZER M.P., WITKOWSKI J.T., ROBINS R.K.
Nuclear magnetic resonance determination of Syn and Anti conformations in pyrimidine nucleosides.
J. Amer. Chem. Soc. 93(1) (1971) 277.

67 - SHIEGEURA H.T.
Antibiotics. I Mechanism of action (1967)
Gottlieb & Shaw Eds. Springer Verlag. Heidelberg.

68 - SHIEGEURA H.T., GORDON C.N.
1/ Hadacidin, a new inhibitor of purine biosynthesis
J. Biol. Chem. 237 (1962) 1932.

2/ Mechanism of action of hadacidin.
J. Biol. Chem. 237 (1962) 1937.

69 - SLECHTA L.
Biochem. Pharmacol. 5 (1960) 96

70 - SMITH D.A., WISSER D.W.
Studies on 5-hydroxyuridine.
J. Biol. Chem. 240 (1965) 446.

71 - SMITH L.H., SULLIVAN M.
Feedback inhibition by fluorinated pyrimidines.
Biochim. Biophys. Acta 39 (1960) 554.

72 - STOCK C.C., CLARKE D.A., REILLY C.H., RHOADS C.P., BUCKLEY S.M.
Asaserine, a new tumor inhibitory substance. Studies with Croker mouse sarcoma 180.
Nature (London) 173 (1954) 71.

73 - SUHADOLNIK A.J.
Nucleoside antibiotics. (1970)
Wiley Ed. New York.

74 - SUSS R., WOLM M.
Rapid screening of macromolecular synthesis in single cell cultures.
Naturwiss. 55 (1968) 134.

75 - SWIERKOWSKI M., SHUGAR D.
A non mutagenic thymidine analogue with antiviral activity : 5-ethyl deoxyuridine.
J. Med. Chem. 12 (1969) 533.

76 - SZYBALSKI W., IYER V.N.
Antibiotics I Mechanism of action (1967)
Gottlieb & Shaw Eds. Springer Verlag. Heidelberg.

77 - WANG M.C., BLOCK A.
Studies on the mode of action of 3-deazapyrimidines.
Biochem. Pharmacol. 21 (1972) 1063.

78 - WARD D.C., REICH E.
Ann. Reports Medic. Chem. 1969 (1970) 272.

79 - WEHRLI et Coll.
RNA polymerase and transcirption.
L. Silvestri Ed. North Holland. Amsterdam (1970)

80 - WEHRLI W., NUESCH J., KNUSEL F., STAEHELIN M.
Action of rifamycins on RNA polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 157 (1968) 215.

81 - WEHRLI W., STAEHELIN M.
The rifamycins. Relation of chemical structure and action on RNA polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 182 (1969) 24.

82 - WEINSTOCK I.M., MEI YU DJU.
Thymidine phosphorylation and thymidylate kinase in developping breast muscle of normal and distrophic chicken.
Biochim. Biophys. Acta 232 (1971) 5.

83 - WOOLEY D.W.
3-methyl aspartic acid as a potent antimetabolite of aspartic acid in pyrimidine biosynthesis.
J. Biol. Chem. 235 (1960) 3238.

84 - WYNGAARDEN J.B., ASHTON D.M.
The regulation of activity of phosphoribosylpyrophosphate amido transferase by purine ribonucleotides : a potential feedback control of purine biosynthesis.
J. Biol. Chem. 234 (1959) 1492.

85 - YATES R.A., PARDEE A.B.
Control of pyrimidine biosynthesis in E. coli by a feedback mechanism control.
J. Biol. Chem. 221 (1956) 757.

VU

Grenoble, le 12 Juillet 1973

Le Président de la thèse

F. Barnoud

VU, et permis d'imprimer,

Grenoble, le 05 SEP. 1973

Le Président de l'Université
Scientifique et Médicale

Gabriel Cau